

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Medicina y Cirugía Animal I



**CARACTERIZACIÓN DE LA CONGELABILIDAD Y
MEJORA DE LOS DILUYENTES DE CRIOCONSERVACIÓN
ESPERMÁTICA EN PORCINO IBÉRICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Eduardo de Mercado de la Peña

Bajo la dirección de los doctores
Raúl Sánchez Sánchez
Antonio González de Bulnes López
Juan Atanasio Carrasco Manzano

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-1007-0

©Eduardo de Mercado de la Peña, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE LA CONGELABILIDAD
Y MEJORA DE LOS DILUYENTES DE
CRIOCONSERVACIÓN ESPERMÁTICA EN
PORCINO IBÉRICO**

EDUARDO DE MERCADO DE LA PEÑA

DIRECTORES DE TESIS

RAÚL SÁNCHEZ SÁNCHEZ

ANTONIO GONZÁLEZ DE BULNES LÓPEZ

JUAN ATANASIO CARRASCO MANZANO

MADRID, 2011

Este trabajo ha sido financiado a través del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), mediante una beca predoctoral y el proyecto N° RZ2004-00035-C03-00 de la convocatoria del Subprograma Nacional de Conservación de Recursos Genéticos de Interés Agroalimentarios (Subproyecto 2 titulado “Valoración de la capacidad fecundante *in vivo* e *in vitro* de dosis congeladas procedentes de un Banco de Semen de raza Ibérica”), así como el proyecto “Creación de un banco de semen congelado de cerdo de raza Ibérica: Valoración de la capacidad fecundante de las dosis seminales y control sanitario por técnicas moleculares” del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

A mi familia y a Cris

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis directores de tesis, Raúl Sánchez Sánchez, Antonio González de Bulnes y Juan Atanasio Carrasco Manzano, por su ayuda, dedicación y por todos los conocimientos impartidos, sin los que no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A Emilio Gómez, sin el cual no estaría hoy aquí, gracias por tu apoyo, dedicación y paciencia, por ayudarme en los momentos malos y estar siempre ahí para echarme una mano, ¡gracias por todo Emilio!

A todos los compañeros del Centro de Pruebas de Porcino, tanto a los que están como a los que se fueron, por hacerme sentir en el trabajo como en mi propia casa.

A toda la gente de Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, en especial a Ana Larrán y Sara Olmedo por su apoyo y generosidad; y a Marta Hernández por su gran ayuda en la parte experimental de esta tesis.

A los compañeros de INIA, Ernesto, Mercedes, Caridad..., a Lucía del CSIC, y a la gente de Murcia, por ayudarme en mis andanzas experimentales y soportar mis zarpas en sus laboratorios.

A mis Padres por ser mi mayor apoyo en todo, estar siempre ahí, para ayudarme, quererme, y también soportarme, que ya es trabajo.

A mi hermano y la política, por aguantarme en general y en particular por tirar solo una bota y dejarles toda la noche esperando la otra.

A toda mi Familia y en especial a mi abuela, quien con su cariño y enseñanzas me ha hecho ser mejor persona.

A mis amigos que me soportan día a día, Rico, Almu-chini, Javi, Vir y Dani y los que me soportan en la lejanía, Vir, Ali, Sergio, Sandra, Tranchete, Silvia, Elías, Quique, Vicky y Alex, por vuestra amistad incondicional, vuestro apoyo en los malos momentos y por todos las grandes experiencias que me habéis hecho vivir, ¡¡¡gracias chicos!!!

Al resto de amigos, demasiados para citarlos a todos, pero también muy importantes para mi, gracias al resto de amigos de Segovia, Murcia, Soria, Guada y Valencia, ¡¡¡gracias por aguantar mis bromas y hacerme reír!!!

Y por último pero para mí la más importante gracias a ti Cris, por quererme, por aguantarme, por estar siempre ahí para mí, por ser como eres, por tu ayuda incondicional y porque sin ti nunca podría haber terminado esta tesis. Gracias Cris, te quiero.

RESUMEN

RESUMEN

El cerdo Ibérico es una raza autóctona española en la que quedan englobadas diferentes variedades y estirpes de cerdos de la península Ibérica y sus islas. Su censo se ha visto disminuido notablemente desde la década de los 50, debido a factores como la peste porcina africana, el cambio en la estructura productiva y el sobrecruzamiento con razas más prolíficas como el Duroc Jersey, usándose mayoritariamente solo las variedades Ibéricas con mejores índices reproductivos y productivos. Esto hace que cada vez se utilicen menos, determinadas variedades, lo que causa la pérdida de variabilidad genética intrínseca de esta raza. Para conservar esta variabilidad, una de las técnicas actuales más utilizadas es la crioconservación espermática. Esta técnica está bien tipificada y es de fácil repetibilidad entre laboratorios, pero en la que existe el problema de la selección de los animales destinados para la conservación de su genética. Esta selección es un problema porque existe una susceptibilidad individual al proceso de congelación espermática en la especie porcina, encontrándose animales cuyos espermatozoides congelarán bien y otros que no. Además otro problema del proceso de crioconservación es que los diluyentes usados para la congelación, no han sufrido modificaciones en más de 20 años y además, durante este proceso se desecha una parte fundamental del eyaculado, el plasma seminal.

Los objetivos de este trabajo han sido la caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo Ibérico y el estudio de su congelabilidad, la determinación precoz de machos por su congelabilidad usando el ChemSensor, la determinación del diluyente más adecuado para la crioconservación espermática del cerdo Ibérico, así como el estudio del efecto de la inclusión del plasma seminal en el proceso de crioconservación para tratar de conservar el eyaculado completo.

Para el estudio de la congelabilidad, se valoraron post-descongelación 37 eyaculados de cerdos Ibéricos de distintas variedades, teniendo en cuenta su viabilidad y motilidad total para su clasificación. Dichos resultados se correlacionaron con el perfil obtenido del análisis de los compuestos volátiles del semen, de la composición lipídica de la membrana del espermatozoide y del plasma seminal, así como de la composición proteica del plasma seminal. Para cada uno de los casos se determinaron 2 grupos de congelabilidad, buenos y malos congeladores, obteniendo solo diferencias significativas en el caso de las proteínas seminales, pudiéndose relacionar un mayor porcentaje de las proteínas de 15-kDa con animales que presentan una buena congelabilidad espermática.

En cuanto a la diferenciación precoz de los animales por su congelabilidad espermática, se obtuvieron buenos resultados en la determinación entre los dos grupos de congelabilidad (buenos y malos congeladores). Observándose que el uso del semen completo para la discriminación, es la manera más fiable de diferenciar los eyaculados y aunque las distancias de separación encontradas entre los dos grupos de congelabilidad, no eran significativas, al tener un número tan bajo de réplicas se podrían considerar adecuadas.

Para la determinación del diluyente más adecuado para la crioconservación espermática del cerdo Ibérico, se compararon tres tipos de diluyentes basados en tres técnicas diferentes según autores: Westendorf *et al.*, 1975; Pursel y Johnson, 1975 y Thilmant, 1997, siendo éste último el diluyente de congelación que recomienda la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998) para la conservación de recursos zoogenéticos porcinos. Y completando este experimento se evaluó el efecto de la inclusión del *Orvus es Paste* en el diluyente I y II (Thilmant, 1997) o solo en el diluyente II (Westendorf *et al.*, 1975 y Pursel y Johnson, 1975). En los resultados obtenidos se observó que el diluyente de Westendorf *et al.*, 1975 (Lactosa-yema de

huevo) con *Orvus es Paste* solo en el diluyente II era el medio de congelación más adecuado para la crioconservación de espermatozoides de cerdo Ibérico.

Asimismo, este mismo diluyente se usó para investigar el efecto de la inclusión del plasma seminal en el medio de congelación, sustituyendo el agua de dilución por diferentes porcentajes de plasma seminal (0%, 10%, 25%, 50%, 75% y 100%). Los resultados obtenidos mostraron que por encima de un 25% de plasma seminal en el medio, la osmolaridad de este se elevaba notablemente, produciendo un daño sobre las membranas de los espermatozoides. Además se observó que el diluyente con un 25% de plasma seminal mantenía durante más tiempo las características óptimas de los espermatozoides, determinándose un efecto protector del plasma seminal a lo largo del tiempo de incubación y siendo solo significativo cuando el plasma seminal se encontraba durante el proceso de congelación y no solo durante la descongelación.

Los resultados de este trabajo indican que es posible mejorar la crioconservación espermática del cerdo ibérico, tanto usando un diluyente adecuado, como incorporando un 25% de plasma seminal a dicho medio, así como seleccionando previamente aquellos machos que vayan a congelar bien por medio del ChemSensor. Asimismo se ha observado que mediante el estudio de diferentes compuestos del eyaculado, la resistencia al proceso de congelación esta más relacionada con las proteínas del plasma seminal, que con la composición en ácidos grasos de la membrana del espermatozoide.

Palabras clave: recursos zoogenéticos, cerdo Ibérico, espermatozoides, plasma seminal, crioconservación, congelabilidad.

SUMMARY

SUMMARY

The Iberian pig is an autochthonous Spanish breed that is subsumed in the different varieties and strains of pigs from the Iberian Peninsula and their islands. Its census has been reduced significantly since the 50's decade, due to factors such as African Swine Fever, the change in production structure and the crossover with prolific breeds such as Duroc Jersey, and being used predominantly Iberian strains with better reproductive and productive rates. This provoked a decrease in the use of certain varieties or strains, causing the loss of inherent genetic variability in this breed. To preserve this variability, the most used technique is the sperm cryopreservation. This technique is well characterized and it is easily reproducible between laboratories, but exist a problem according to the selection of animals destined for genetic conservation. This selection is a problem because there is individual susceptibility to the freezing process between boars. There are animals whose sperm freezes well and others not. In addition another problem is that the diluents used for sperm cruopreservation have not been modified in over 20 years, and also during this process a fundamental part of the ejaculate, the seminal plasma, is discarded,

The aims of this work have been the biochemical and functional characterization of the Iberian pig ejaculated and study of its freezability, the early identification of males by its freezability using the ChemSensor, determination the most appropriate diluent for sperm cryopreservation of Iberian pig, and the study of the effect of the inclusion of seminal plasma in these diluents to try to preserve the whole ejaculate.

To study the freezability 37 ejaculates of different strains of Iberian pigs were assessed post-thawing taking into account the viability and total motility for the classification. And these results were related with the profile obtained from the analysis

of volatile compounds in semen, the membrane lipid composition of sperm and seminal plasma and the seminal plasma protein composition. For each of the cases were determined 2 groups of freezability, good and bad freezers, obtaining significant differences only in the case of seminal proteins, being able to relate the 15-kDa protein to animals with a good freezability. It was obtained good results in early differentiating between the two groups of freezability (good and bad freezers). It observed that using the whole ejaculate for the discrimination is the most reliable way of discriminating the ejaculates, although the separation distances found between the two groups of freezability, were not significant, it should be noticed that a low number of replicas were used, hence could be considered as an appropriate discriminatory test.

To determine the most appropriate media for sperm cryopreservation of Iberian pig, three different types of diluents were compared. These diluents were based on three different techniques according to following authors: Westendorf *et al.*, 1975; Pursel and Johnson, 1975 and Thilmant, 1997. Being this last one the freezing diluent recommended by the FAO (1998) for the conservation of animal genetic resources swine. Completing this experiment the effect of including *Orvus es Paste* in the diluent I and II (Thilmant, 1997) or only in the diluent II (Westendorf *et al.*, 1975, Pursel and Johnson, 1975) was studied. It was observed that the Diluent Westendorf *et al.*, 1975 (Lactose-egg yolk) with *Orvus es Paste* only in the diluent II was the most appropriate freezing media for cryopreservation of sperm of Iberian pig. Furthermore this same diluent was used to investigate the effect of the inclusion of seminal plasma in the freezing medium, replacing the dilution water by different percentages of seminal plasma (0%, 10%, 25%, 50%, 75% and 100%). The results showed that over 25% of seminal plasma in the medium resulted in damage to sperm membranes by the high osmolarity in the media. Furthermore we observed that the diluent with 25% of seminal

plasma maintained for a longer time the optimum characteristics of the sperm, determining a protective effect of seminal plasma during the incubation time and being only significant when the seminal plasma was added during freezing and thawing process, but not only during thawing.

The results of this study indicate that it is possible to improve sperm cryopreservation of Iberian Pig, either using an appropriate freezing media, such as incorporating 25% seminal plasma in that medium, as well as pre-selecting those males that will freeze well through ChemSensor. In addition, we found that the greatest resistance to freezing process is more concerned with seminal plasma proteins than with the fatty acid composition of the sperm membrane.

Keywords: genetic resources, Iberian pig, sperm, seminal plasma, cryopreservation, freezability.

ABREVIATURAS

- % = Porcentaje
- **ADN** = Ácido desoxirribonucleico
- **AECERIBER** = Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto del Tronco Ibérico
- **AG** = Ácido Graso
- **BOE** = Boletín Oficial del Estado
- **BTS** = Beltsville Thawing Solution
- **CA** = Análisis de Agrupaciones
- **CRISP** = Proteínas Secretadas Ricas en Cisteína
- **CSIC** = Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- **DHA** = Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico
- **DPA** = Ácido cis-7,10,13,16,19-docosopentaenoico
- **EAN** = Espermatozoides con Acrosoma Normal
- **EDTA** = Ácido Etilendiaminotetraacético
- **EEM** = Error Estándar de la Media
- **EMP** = Espermatozoides Móviles Progresivos
- **EMPI** = Espermatozoides con Membrana Plasmática Intacta
- **EMPR** = Espermatozoides Móviles Progresivos Rápidos.
- **EMT** = Espermatozoides Móviles Totales
- **EPA** = Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico
- **EVAMI** = Espermatozoides Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta

- **FAO** = Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
- **GC-MS** = Cromatografía de Gases Masas
- **INSAT** = Ácidos Grasos Insaturados Totales
- **IP** = Ioduro de Propidio
- **KNN** = K-Nearest Neighbours
- **MINSAT** = Ácidos Grasos Monoinsaturados
- **pB1** = Proteínas con el dominio fibronectina tipo II
- **PCA** = Análisis de Componentes Principales
- **PCR** = Regresión por Componentes Principales
- **PINSAT** = Ácidos Grasos Poliinsaturados
- **PLS** = Mínimos Cuadrados Parciales
- **PPA** = Peste Porcina Africana
- **RAT** = Ratio de ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados
- **Rho 123** = Rhodamina 123
- **ROS** = Sustancias Oxígeno Reactivas
- **SAT** = Ácidos Grasos Saturados Totales
- **SCA** = Sperm Class Analyzer
- **SIMCA** = Soft Independent Modelling Class Analogy
- **UNEP** = Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente
- **VS** = Versus

iNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Crioconservación Espermática	13
2.1.1. Antecedentes Históricos	13
2.1.2. Principios básicos de la crioconservación espermática y fertilidad del semen descongelado	15
2.1.2.1. Enfriamiento	15
2.1.2.2. Congelación	17
2.1.2.3. Diluyentes de congelación	19
2.1.2.3.A. Crioprotectores	19
2.1.2.3.B. Lipoproteínas	21
2.1.2.3.C. Detergentes	22
2.1.2.3.D. Aditivos	22
2.1.2.3.E. Plasma Seminal	24
2.1.2.4. Fertilidad y prolificidad del semen crioconservado	25
2.1.3. Estrategias para mejorar la viabilidad, fertilidad y prolificidad de los espermatozoides crioconservados porcinos	27
2.1.3.1. Congelabilidad espermática porcina	28
2.1.3.2. Optimización de los protocolos de crioconservación	30
2.1.3.2.A. Geometría de congelación	30
2.1.3.2.B. Mejora en los diluyentes de conservación	31
2.1.3.3. Mejoras en las técnicas de inseminación con semen crioconservado	33
2.1.3.3.A. Implantación de los espermatozoides en el tracto de la hembra	33
2.1.3.3.B. Sincronización del momento de inseminación con el de ovulación	34
2.1.4. Congelación de semen en cerdo Ibérico	35
2.2 El espermatozoide de porcino	38
2.2.1. El espermatozoide	38
2.2.2. Espermatogénesis	39
2.2.3. Maduración	40

2.2.4. Eyaculado	42
2.2.5. Composición de la membrana plasmática	43
2.2.5.1. Glicocálix	43
2.2.5.2. Lípidos	44
2.2.5.2.A. Fosfolípidos	44
2.2.5.2.B. Lípidos neutros	45
2.2.5.3. Proteínas	46
2.3. El plasma seminal	47
2.3.1. Formación y funciones de los componentes del plasma seminal	48
2.3.1.1. Proteínas del plasma seminal	49
2.3.2. El plasma seminal en la congelación espermática	51
2.4. ChemSensor	52
3. OBJETIVOS	57
4. MATERIAL Y MÉTODOS	61
4.1. Resumen del diseño experimental	61
4.2. Material	62
4.2.1. Animales	62
4.2.2. Reactivos y Medios	63
4.2.2.1. Reactivos	63
4.2.2.2. Medios	65
4.2.3. Preparación de los fluorocromos	67
4.3. Métodos	68
4.3.1. Recogida y procesado de los eyaculados	68
4.3.2. Metodología de crioconservación espermática	69
4.3.3. Procedimiento de descongelación	71
4.3.4. Valoración de la calidad espermática a la descongelación	72
4.3.4.1. Motilidad y calidad del movimiento	72
4.3.4.2. Valoración de la viabilidad	74
4.3.4.3. Valoración del estado acrosomal	75
4.3.4.4. Valoración de la actividad mitocondrial	76
4.3.5. Determinación del perfil de ácidos grasos	77

4.3.6. Análisis del plasma seminal por electroforesis capilar	82
4.3.7. Análisis de los volátiles presentes en el semen	87
4.3.8. Análisis con el ChemSensor	90
4.4. Diseño experimental	93
4.4.1. Experiencia 1: Caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo Ibérico y estudio de su congelabilidad. Uso del ChemSensor como herramienta discriminadora de la congelabilidad entre machos según el perfil de fracciones básicas de volátiles y ácidos grasos	93
4.4.2. Experiencia 2: Optimización de los diluyentes de congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico	95
4.4.2.1. Experimento 1: Valoración de tres diluyentes de crioconservación definidos en la congelación para espermatozoides de cerdo Ibérico. Estudio del efecto de un detergente sintético sobre la calidad espermática	95
4.4.2.2. Experimento 2: Estudio del efecto de la inclusión del plasma seminal en el diluyente de congelación	96
4.4.2.2.1. Experimento 2A: Efecto de la sustitución del agua del diluyente de congelación por plasma seminal	97
4.4.2.2.2. Experimento 2B: Efecto de la incubación prolongada de las muestras congeladas con plasma seminal	98
4.4.2.2.3. Experimento 3C: Efecto del plasma seminal en la descongelación e incubación prolongada	99
4.5. Análisis estadístico	100
5. RESULTADOS	105
5.1. Experiencia 1: Caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo ibérico y estudio de su congelabilidad. Uso del ChemSensor como herramienta discriminadora de la congelabilidad entre machos según el perfil iónico de volátiles y ácidos grasos	105
5.1.1. Determinación de la congelabilidad y clasificación de los eyaculados	106
5.1.2. Relación entre volátiles del semen y la congelabilidad	108
5.1.3. Determinación del perfil de ácidos grasos	108
5.1.3.1. Extracción de ácidos grasos en pellet de espermatozoides	108

5.1.3.2. Extracción de ácidos grasos en plasma seminal	110
5.1.4. Análisis del plasma seminal por electroforesis capilar	111
5.1.5. Evaluación del ChemSensor como herramienta de discriminación entre grupos de clasificación del potencial de congelabilidad del semen de cerdo Ibérico	112
5.1.5.1. Análisis de la fracciones másicas	112
5.2. Experiencia 2: Optimización de los diluyentes de congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico	116
5.2.1. Experimento 1: Valoración de tres diluyentes de crioconservación definidos en la congelación para espermatozoides de cerdo Ibérico. Estudio del efecto de un detergente sintético sobre la calidad espermática	116
5.2.2. Experimento 2: Estudio del efecto de la inclusión del plasma seminal en el diluyente de congelación	120
5.2.2.1. Experimento 2A: Efecto de la sustitución del agua del diluyente de congelación por plasma seminal	120
5.2.2.2. Experimento 2B: Efecto de la incubación prolongada de las muestras congeladas con plasma seminal	125
5.2.2.3. Experimento 3C: Efecto del plasma seminal en la descongelación e incubación prolongada	131
6. DISCUSIÓN	139
6.1. Experiencia 1: Caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo Ibérico y estudio de su congelabilidad. Uso del ChemSensor como herramienta discriminadora de la congelabilidad entre machos según el perfil iónico de volátiles y ácidos grasos	139
6.1.1. Determinación de la congelabilidad y clasificación de los eyaculados	139
6.1.2. Relación entre la composición de volátiles en semen y su resistencia a la congelabilidad	140
6.1.3 Determinación del perfil de ácidos grasos	142
6.1.3.1. Extracción de ácidos grasos en pellet de espermatozoides	142
6.1.3.2. Extracción de ácidos grasos en plasma seminal	145
6.1.4. Análisis del plasma seminal por electroforesis capilar	147

6.1.5. Evaluación del ChemSensor como herramienta de discriminación entre grupos de clasificación del potencial de congelabilidad del semen de cerdo Ibérico	152
6.2. Experiencia 2: Optimización de los diluyentes de congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico	157
6.2.1. Experimento 1: Valoración de tres diluyentes de crioconservación definidos en la congelación para espermatozoides de cerdo Ibérico. estudio del efecto de un detergente sintético sobre la calidad espermática	157
6.2.2. Experimento 2: Estudio del efecto de la inclusión del plasma seminal en el diluyente de congelación.	162
6.2.2.1. Experimento 2A: Efecto de la sustitución del agua del diluyente de congelación por plasma seminal	162
6.2.2.2. Experimento 2B: Efecto de la incubación prolongada de las muestras congeladas con plasma seminal	166
6.2.2.3. Experimento 2C: Efecto del plasma seminal en la descongelación e incubación prolongada	168
7. CONCLUSIONES	175
8. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	179
9. BIBLIOGRAFÍA	185

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cerdo Ibérico está considerado como una raza autóctona española (BOE, 3 de marzo del 2006. ORDEN APA/661/2006), pero para la mayoría de los autores se trata de una agrupación racial donde quedan incluidas diferentes variedades del cerdo Ibérico (Diéguez, 1999; Clemente *et al.*, 2006). Esta raza al igual que el resto del porcino, procede del jabalí primitivo (Género *Sus*) y surge en la península Ibérica después de siglos de diferenciación y expansión en el sexto milenio a. de C. (Berrocal *et al.*, 1995). La evolución de esta raza ha ido estrechamente ligada al entorno donde cohabita, la dehesa, donde se usan los recursos naturales de este ecosistema para la alimentación de los animales. Este tipo de explotación se ha realizado a lo largo de los últimos siglos, y conlleva un manejo más tradicional de los animales, donde apenas han sido seleccionados, conservándose así sus características genéticas típicas, como un mayor engrasamiento o una menor prolificidad.

A partir de los años 50 el cerdo Ibérico registró una importante disminución en su censo, motivado mayoritariamente por la peste porcina africana (PPA), el cambio en la estructura productiva y la consecuente modificación racial del Ibérico. A causa de la PPA gran parte de la cabaña Ibérica murió o fue sacrificada (Vargas y Aparicio, 2001), hecho al que se sumó más tarde, el paso de un sistema de producción extensivo, donde las razas autóctonas se integraban perfectamente en el medio y aprovechaban los recursos naturales, a un sistema más intensificado con una ganadería intensiva y consumidora de concentrados, donde razas autóctonas como el Ibérico fueron sustituidas en gran medida por otras razas mejor adaptadas a un sistema intensivo, como son las razas inglesas Large White y Landrace (conocidas como cerdos de capa blanca).

Todos estos cambios afectaron sustancialmente al espectro de las razas porcinas que se explotaron y que se explotan actualmente. De esta manera mientras que en la década de los 50, entre el 60-65% de las razas que se usaban eran razas autóctonas de la variedad Ibérica o Celta, en 1986 (última fecha en la que se llevó acabo el censo desglosado por razas) apenas constituía un 5% del total (3,9% de cerdo Ibérico).

Fue solo a partir de los años 80, cuando el censo del Ibérico comenzó a aumentar paulatinamente, como repercusión de una mayor demanda por parte del consumidor de productos elaborados de mayor calidad y bien diferenciados, como los del cerdo Ibérico (Ruiz *et al.*, 1998). El cerdo Ibérico es una raza con un alto potencial adipogénico, que le confiere la capacidad de acumular grasa intramuscular (Daza *et al.*, 2007 y Óvilo, 1999). Esta capacidad otorga a los productos cárnicos ibéricos, y en especial a los productos curados, una alta calidad nutricional y gustativa por su alto contenido en ácidos grasos insaturados (Niñoles *et al.*, 2007).

El problema del aumento de la demanda de productos ibéricos es que, debido a sus características genéticas el cerdo Ibérico, posee unos parámetros productivos peores que los de otras razas de capa blanca más seleccionados, como un menor número de lechones por camada o una menor velocidad de crecimiento (Ramírez y Cava, 2007), lo que hizo que los ganaderos buscasen formas de rentabilizar su producción. Para ello los productores optaron por aquellas variedades de Ibérico con mejores caracteres productivos, relegando al resto de variedades a una situación real de peligro de extinción (Aparicio Macarro, 1988). Se comenzó a realizar cruzamientos con cerdos de raza Duroc, los cuales al tener un mayor índice de grasa infiltrada que otras razas de capa blanca y ser de capa oscura los hacían adecuados para que en los cruces no se perdiera calidad de la carne. Estos cruzamientos aumentaron notablemente los parámetros productivos, pero en muchas ocasiones se hicieron sin control y de forma

indiscriminada, hasta la publicación en 2001 (BOE, 15 de octubre del 2001. Real Decreto 1083/2001) de la normativa que solo permite cruces entre Ibérico y Duroc, siempre y cuando la línea materna sea Ibérica pura, preservándose así la pureza de la base genética. Estos hechos ponen de manifiesto que los datos oficiales del censo total de cerdos Ibéricos no sean del todo correctos, ya que un gran porcentaje (entorno al 35-40%) de los cerdos censados como “Ibéricos”, en realidad son cerdos cruzados. Este hecho fue constatado por la asociación AECERIBER (Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto del Tronco Ibérico) en 1995, la cual mediante una encuesta censal observó, que de un censo de 155.799 reproductoras el 60% eran ibéricas puras y el 40% cruzadas.

El hecho de que cada vez se usen menos determinadas variedades, sumado con el sobrecruzamiento con otras razas, ha causado la pérdida de variabilidad genética intrínseca de esta raza. La diversidad de las especies domésticas, viene dada por las diferencias genéticas de cada una de las razas que engloba una especie y que se han ido desarrollando durante millones de años de evolución, formación y estabilización. Debido a que esta diversidad viene marcada por las diferencias genéticas entre razas, es de crucial importancia la conservación de las mismas, y no solamente de las especies (FAO, 1993). Además en lo referente a los animales domésticos como el cerdo, la ventaja de la diversidad genética tiene su base en las valiosas características que a menudo tienen las diferentes razas, como por ejemplo la resistencia a enfermedades, que en el caso del porcino mejoraría los sistemas de producción aumentando el número de animales y reduciendo el coste en medicamentos e incluso en la elaboración de los piensos.

El proceso de erosión genética afecta de manera global a múltiples especies. La globalización de los sistemas de producción intensiva, el rápido crecimiento

demográfico y la mayor demanda de productos alimenticios, ha llevado a una concentración de explotaciones con una gran mejora a nivel productivo, pero con una disminución de la variabilidad genética y como consecuencia, a la desaparición parcial o total (extinción) de razas, variedades, estirpes y líneas menos adecuadas a dichos sistemas (Delgado y Ollivier, 2000; Hiemstra, 2004).

Debido a esta situación en 1992, en la Segunda Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medioambiente y el Desarrollo celebrada en Río de Janeiro, se reconoció la importancia de los recursos genéticos de los animales domésticos. Y se concienció a todas las naciones de la necesidad de conservar y estudiar los recursos genéticos autóctonos de cada país, ya que constituyen un importante componente dentro de la biodiversidad global (Oldenbroek, 1998).

Para conservar dichos recursos genéticos autóctonos existen dos métodos, la conservación “*in situ*” y la conservación “*ex situ*” (FAO, 1998). La conservación “*in situ*” se realiza a partir de animales vivos enclavados en su hábitat natural o áreas de difusión. Con este método la actividad prioritaria es la conservación y mantenimiento en su hábitat del mayor número posible de animales vivos, conservando la mayor diversidad genética y la menor consanguinidad posible (Barba *et al.*, 2000).

La conservación “*ex situ*” engloba todos los demás casos, subdividiéndose en la conservación de animales vivos, pero que se mantienen fuera de sus condiciones naturales como en el caso de granjas, parques o reservas naturales; y en la preservación de genética mediante recolección y criopreservación de muestras biológicas como: semen, ovocitos, embriones o tejidos vivos, creando así bancos de germoplasma que podrán ser utilizados para regenerar o recuperar dichos animales en un futuro (FAO/UNEP, 1995).

La elección de un método u otro va a depender del tamaño y la capacidad reproductiva de la especie o raza a conservar y del objetivo de dicha conservación. Aunque algunos autores como Gandini y Oldenbroek (1999) recomiendan la conservación “*ex situ*” de animales vivos en áreas de protección natural, granjas especiales o zoológicos, resultan más rentables los métodos de crioconservación. Sin embargo, se debe tener en cuenta que no todas estas técnicas obtienen los mismos resultados cuando se aplican en unas u otras especies.

En el caso del porcino, la congelación de ovocitos o embriones tiene escasos resultados positivos debido a su alta sensibilidad al descenso de temperatura (Berthelot *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008). De igual forma, con el uso de semen congelado se obtienen bajos rendimientos reproductivos, con tasas de fertilidad y prolificidad de un 20 y 30% respectivamente, menores que con el semen fresco, y 2-3 lechones menos por parto (Polge *et al.*, 1970; Graham *et al.*, 1971; Johnson *et al.*, 2000). Pero los recientes avances realizados en esta metodología, como la mejora de los diluyentes de congelación (He *et al.*, 2001; Roca *et al.*, 2004; de Mercado *et al.*, 2009), la optimización de rampas de congelación (Thurston *et al.*, 2003), los nuevos sistemas de envasado (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000) o las mejoras en la metodología de inseminación (Roca *et al.*, 2002; Bolarín *et al.*, 2006), hacen que se optimicen los resultados obtenidos usando el semen congelado. Sin embargo, a pesar de estas mejoras su uso queda relegado a su utilización en programas de conservación genética o mantenimiento de líneas o individuos.

En la actualidad, la metodología de crioconservación espermática de razas porcinas en peligro de extinción implica dos partes importantes, la selección de los animales y la congelación de sus eyaculados. Para la selección de los machos destinados a la crioconservación, la mayoría de los autores recomiendan solo el uso de aquellos

animales que proporcionen semen de mejor calidad y con un alto nivel de congelabilidad (Martín, 1982 y Thilmant, 1997). El problema es la existencia de una susceptibilidad individual al proceso de congelación en la especie porcina (Larsson y Einarsson, 1976; Reed, 1985), siendo pocas las investigaciones hechas para determinar sus causas (Joyal, 1986; Roca *et al.*, 2006). Por ello debe considerarse como objetivo principal para mejorar la eficiencia del semen crioconservado, el conocimiento de las causas que condicionan esa variabilidad y lograr un método de determinación precoz, que ayude a determinar la congelabilidad de eyaculados, previamente al proceso de congelación, evitando el coste de congelar y descongelar muestras para determinar su calidad tras la descongelación.

La congelación de semen de porcino, es una técnica conocida, bien tipificada (Martín, 1982; Thilmant, 1997; Bussiére, 2000) y de fácil repetibilidad entre laboratorios. Sin embargo, existen pocos estudios en lo referente a razas en peligro de extinción, como es el caso de algunas variedades del cerdo Ibérico. El protocolo recomendado en la actualidad para la congelación de semen de porcino de razas en peligro (FAO, 1998), se basa en la técnica de Thilmant (1997), usada para la conservación de razas porcinas autóctonas de la zona de Francia, y adaptada con pequeñas modificaciones para la congelación de semen de cerdo Ibérico (Sereno *et al.*, 2003). El diluyente usado en este método no ha sufrido modificaciones en más de 10 años y al ser una de las partes más importantes en el proceso de congelación, es necesario centrar las investigaciones en la determinación de los diluyentes más adecuados, así como en la valoración de algunos de sus componentes principales. Además de estas investigaciones, otra parte fundamental a la hora de la conservación del semen es que se debe tener en cuenta las propiedades del plasma seminal. Este componente es tradicionalmente descartado durante el proceso de congelación para la

concentración de los espermatozoides, pero es un elemento muy necesario al ser un regulador de procesos espermáticos y de la fecundación, en el tracto genital de la hembra. Proporciona protección al espermatozoide en el tracto genital de la cerda, regula la motilidad y capacitación de los espermatozoides, e interviene en el reconocimiento y unión entre gametos (Johnson *et al.*, 2000). Por ello es necesario valorar, su posible inclusión en el proceso de congelación de los espermatozoides, conservando así el eyaculado completo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CRIOCONSERVACIÓN ESPERMÁTICA

2.1.1. Antecedentes Históricos

Los protocolos de criopreservación espermática se desarrollaron notablemente, para la mayoría de especies domésticas, desde el descubrimiento del potencial del glicerol como el mejor agente crioprotector (Polge *et al.*, 1949). Poco después se obtuvieron los primeros resultados de viabilidad espermática post-descongelación en la especie porcina (Polge, 1957). Sin embargo, fue a partir de la década de los 70, en que se obtuvieron las primeras camadas usando espermatozoides criopreservados (Polge *et al.*, 1970; Crabo y Einarsson, 1971; Graham. *et al.*, 1971), cuando comienza a tener mayor relevancia el uso del semen congelado. Así, se instauran protocolos específicos para el porcino, sistemas de envasado, diluyentes adecuados y ensayos de campo inseminando cerdas. A pesar de todos los avances alcanzados, la fertilidad y prolificidad conseguidas con el semen congelado eran inferiores a las obtenidas con semen fresco (refrigerado 15 °C); con diferencias de 20-30% de tasa de fertilidad y 2-3 lechones menos (Polge *et al.*, 1970; Graham *et al.*, 1971; Johnson *et al.*, 2000).

El hecho de no poder competir con el semen fresco, ha relegado el uso del semen congelado a programas de mejora genética exclusivamente, para la producción (en pureza) de animales en granjas de selección (Almlid *et al.*, 1996) y a la conservación de recursos zoogenéticos en especies en peligro de extinción, generalmente dentro de programas institucionales (Labroue *et al.*, 2000). Pero a pesar de este papel secundario, el semen congelado ofrece diferentes ventajas respecto al

semen fresco, tales como posibilitar el comercio internacional de dosis seminales, la creación de bancos de semen, el aprovechamiento óptimo de verracos de gran valor genético, la minimización del efecto de la estación en la calidad seminal y la optimización de la gestión y operatividad de los centros de inseminación artificial.

En la actualidad, los esfuerzos se están enfocando en la mejora del semen congelado, mediante investigaciones centradas en aquellos aspectos que puedan mejorar su calidad y eficacia de aplicación. Aspectos tales como: la identificación de las diferencias existentes entre verracos, que afectan a la congelabilidad y que permiten clasificar los verracos como “buenos” o “malos” congeladores (Watson, 1995; Thurston *et al.*, 1999; Hernández, 2007), desarrollar nuevas estrategias de inseminación artificial (como sería el caso de la inseminación intrauterina profunda, para depositar los espermatozoides descongelados en la zona próxima a la unión útero-tubárica) por lo que se requeriría un menor número de espermatozoides en cada inseminación (Sánchez *et al.*, 1987; Roca *et al.*, 2002; Bolarin *et al.*, 2006), adecuar el momento de inseminación al de la ovulación y por último optimizar los protocolos de criopreservación para mejorar la viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados, ya sea buscando nuevos sistemas de envasado (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000), optimizando las rampas de congelación mediante el uso de biocongeladores programables (Thurston *et al.*, 2003) o mejorando los diluyentes de congelación (He *et al.*, 2001; Roca *et al.*, 2004; de Mercado *et al.*, 2009). Factores todos ellos que afectan de manera determinante a la calidad espermática, pero que a pesar de su importancia, se han modificado escasamente en los últimos 30 años.

2.1.2. Principios básicos de la crioconservación espermática y fertilidad del semen descongelado

El proceso de congelación de los espermatozoides supone una interrupción del metabolismo de la célula espermática, por tanto el objetivo de la crioconservación es que, manteniendo indefinidamente este estado celular, no se altere la capacidad fecundante de los espermatozoides una vez descongelados (Watson, 1995). Para que el método de criopreservación sea satisfactorio es necesario un conocimiento detallado de los factores, tanto internos (aquellos propios del animal y la célula, que no se pueden modificar) como externos (aquellos que sí podemos manipular), que intervienen en la supervivencia espermática; así como de sus posibles interacciones (Johnson *et al.*, 2000).

2.1.2.1. Enfriamiento

En todo protocolo de congelación, existe una fase inicial de descenso de temperatura desde los niveles fisiológicos hasta valores ligeramente por encima de 0 °C. Este enfriamiento causa un estado de hipotermia frente al cual el espermatozoide puede sufrir daños. La severidad del daño depende de la velocidad de enfriamiento, la duración y la temperatura final alcanzada. A este respecto, los espermatozoides porcinos se muestran extremadamente sensibles a descensos por debajo de los 15 °C (Pursel *et al.*, 1973a).

Uno de los signos más evidentes de daño causado por el choque térmico (Watson, 1995) es la pérdida irreversible de motilidad, seguida por la lesión de las membranas plasmática, acrosomal, y mitocondrial. A estos efectos se suma el aumento

de la permeabilidad de la membrana plasmática (Ortman y Rodríguez-Martínez, 1994) y la pérdida de lípidos de la misma (Plummer y Watson, 1985; White 1993). Algunos de estos cambios se han relacionado con los ocurridos durante la capacitación espermática, por ello se incluyen en los denominados “*capacitation-like changes*” (Green y Watson, 2001). En los espermatozoides de porcino, el enfriamiento causa un aumento del número de estos espermatozoides capacitados (Green y Watson, 2001, Kaneto *et al*, 2002, Vadnais *et al.*, 2005).

La susceptibilidad al daño por enfriamiento en los espermatozoides de las distintas especies se atribuye al rango de temperaturas en el que se producen los cambios de fase líquida a gel, en los lípidos de membrana (Parks y Lynch, 1992; Drobnis *et al*, 1993; Arav *et al*, 2000). De esta manera, en los espermatozoides de porcino la mayor susceptibilidad al choque térmico se ha relacionado con un menor ratio colesterol:fosfolípidos, particularidad que permite un cambio de transición de fase líquido-gel a mayores temperaturas durante el enfriamiento, y por tanto un aumento de la susceptibilidad al daño por enfriamiento (Parks y Lynch, 1992; Drobnis *et al.*, 1993, White, 1993; Brouwers *et al.*, 2005). Sin embargo, la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos está compartimentalizada en regiones o dominios que son bioquímica y funcionalmente distintos (Canvin y Buhr, 1989; Mackie *et al.*, 2001), lo que implica múltiples temperaturas de transición de cambio de fase en una misma membrana plasmática, convirtiéndose en un complejo mosaico líquido-gel (Wolfe *et al.*, 1998).

La incorporación de yema de huevo durante el proceso de enfriamiento protege a los espermatozoides del daño por choque térmico (White, 1993; Buhr *et al.*, 2000), debido a los fosfolípidos de su composición. En la misma línea, la adición de ciclodextrinas a un medio con yema de huevo, ya sean solas (Zeng y Terada, 2000,

2001) o conjuntamente con colesterol (Galantino-Homer *et al.*, 2006) parece proporcionar también cierta protección a los espermatozoides porcinos frente al enfriamiento.

2.1.2.2. Congelación

Los daños producidos en la célula espermática, durante el proceso de congelación y descongelación son consecuencia de la formación de hielo y de su fusión, los cuales, a su vez, dependen de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, respectivamente (Watson, 1995).

Durante el proceso de congelación, al alcanzar la temperatura de -5 °C, el agua extracelular e intracelular, a pesar de estar por debajo de su punto de congelación, no está solidificada y se mantiene en un estado de equilibrio débilmente estable llamado sobrefusión o superenfriamiento. Es entre los -5 °C y -10 °C, cuando se produce la formación de cristales de hielo extracelulares, en un proceso denominado “*seeding*”, permaneciendo el espacio intracelular en sobrefusión.

Esta situación hace que de forma espontánea se produzca una difusión del potencial químico del agua, o lo que es lo mismo, una transmisión de energía desde el medio con mayor potencial químico (el medio intracelular en sobrefusión) al medio con menor potencial químico (el medio extracelular en forma de cristales de hielo). Esto hace que el agua de dentro de la célula espermática salga al exterior y la célula se deshidrate. Dependiendo de la velocidad de deshidratación la célula sufrirá más o menos daño.

Así, Mazur en 1965 propuso la teoría de los *dos factores*. Esta teoría propone, la existencia de dos procesos antagónico, que influyen directamente sobre la viabilidad

espermática, durante la criopreservación celular: la formación de hielo intracelular y el “efecto soluto”. Estos dos efectos se correlacionan con la velocidad de enfriamiento; de esta manera, una velocidad de enfriamiento alta provocará que no se deshidrate adecuadamente la célula, formándose cristales de hielo en su interior y una velocidad baja ejercerá un “efecto soluto” (Mazur *et al.*, 1972), es decir, una excesiva deshidratación que producirá una prolongada exposición de los espermatozoides a elevadas concentraciones de solutos, con el consecuente cambio de pH, incremento de la presión osmótica y posible precipitación de los mismos, lo que produciría una alteración celular irreversible (Mazur, 1984). La curva óptima de congelación será aquella que permita alcanzar el equilibrio entre ambas situaciones; así, la velocidad de enfriamiento debe ser lo suficientemente lenta para permitir la deshidratación celular y evitar la formación de cristales de hielo en el interior de la célula y lo suficientemente rápida para evitar la exposición prolongada a elevadas concentraciones de solutos y una excesiva deshidratación (Gao *et al.*, 1997).

La metodología de descongelación se verá influenciada por la velocidad de congelación previa, si ésta ha inducido la formación intracelular de cristales de hielos o la deshidratación. En cualquiera de los casos, las velocidades de descongelación rápidas, son más adecuadas, porque pueden prevenir la formación de hielo intracelular por recrystalización (revisado por Gao *et al.*, 1997).

Aunque la teoría de Mazur es ampliamente aceptada, en la actualidad se plantean otras hipótesis para explicar el daño celular ocurrido en la congelación-descongelación, siendo el estrés osmótico el factor clave (Watson, 1995 y 2000) y no la formación de cristales (Morris, 2006).

El proceso de crioconservación espermática, además de causar diferentes daños como consecuencia del choque frío, el estrés osmótico y la formación de hielo

intracelular durante la congelación y tras la descongelación (Watson, 2000), produce daños sub-letales en los espermatozoides que permanecen vivos después del proceso. Estos daños reducen la vida del espermatozoide y su capacidad fecundante, causando un “envejecimiento prematuro” de la célula, que se caracteriza por alteraciones de la membrana plasmática y pérdida de motilidad (Watson, 1995; 2000).

Un factor que puede minimizar estos daños ocurridos durante la criopreservación es el diluyente de congelación.

2.1.2.3. Diluyentes de Congelación

Entre los factores que afectan de manera determinante la calidad espermática post-descongelación, estarían los diluyentes de congelación. Sin embargo a pesar de su importancia, apenas han sufrido modificaciones en las últimas décadas. En general, los medios de crioprotección incluyen, como principales componentes los agentes crioprotectores, tanto penetrantes (glicerol) como no penetrantes (azúcares), lipoproteínas, detergentes y aditivos (Johnson *et al.*, 2000; Barbas y Mascarenhas, 2009).

2.1.2.3.A. Crioprotectores

Los crioprotectores, añadidos al medio de congelación, permiten a las células sobrevivir al proceso de crioconservación, permitiendo que la salida de agua sea lo suficientemente rápida como para evitar la formación de cristales intracelulares. Sin embargo, el agente crioprotector somete a la membrana del espermatozoide a un estrés

osmótico, cuyo grado dependerá de la relativa permeabilidad del crioprotector y su toxicidad (Gao *et al.*, 1997).

Los crioprotectores se clasifican en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a su permeabilidad celular. Dentro de los crioprotectores penetrantes, el glicerol es el más usado tanto en la especie porcina como en otras muchas especies domésticas (Watson, 1995). El glicerol disminuye el punto de congelación y, consecuentemente minimiza el efecto soluto. Influye en el estrés osmótico debido a su entrada y salida de la célula, así como por su capacidad de insertarse entre los fosfolípidos de las membranas plasmáticas (Watson 1995). Sin embargo según la concentración utilizada, éste puede tener un efecto tóxico sobre las membranas espermáticas (Burh *et al.*, 2001).

El tiempo de exposición del glicerol con la célula espermática no tiene ningún efecto en la viabilidad post-descongelación, ya que penetra en los espermatozoides porcinos en segundos, alcanzando el equilibrio a los 30 segundos (Almlid y Johnson, 1988). De esta forma, gracias a que el glicerol penetra rápidamente en el espermatozoide, puede añadirse justo en el momento antes de la congelación sin necesidad de periodos de equilibrado (Johnson *et al.*, 2000).

Entre los crioprotectores no penetrantes se incluyen azúcares y compuestos de alto peso molecular como la lactosa, sucrosa, rafinosa, fructosa, trehalosa y glucosa, muchos de ellos usados de forma habitual en diferentes diluyentes para porcino (Visser y Salamon, 1974; Westendorf *et al.*, 1975; Pursel y Johnson, 1975; Thilmant, 1997). Estos crioprotectores no pueden difundir a través de la membrana plasmática, quedando en el exterior creando una presión osmótica, que va a inducir la deshidratación celular y por tanto la baja formación de cristales de hielo intracelulares (revisado por Barbas y Mascarenhas, 2008). El uso de estos agentes protectores permite modificar la osmolaridad de los medios, creando así medios hipertónicos (420 y 510 mM) que

favorecen este proceso (Zeng y Terada, 2001). Sin embargo, los crioprotectores no penetrantes no protegen por sí solos en ausencia de agentes penetrantes, pero aumentan la efectividad de los penetrantes o permiten la utilización de éstos en menor concentración (Holt, 2000).

2.1.2.3.B. Lipoproteínas

De forma habitual, los diluyentes de crioconservación espermática incorporan yema de huevo como agente protector contra el choque frío, pero su mecanismo de actuación no está bien definido. Se especula con la hipótesis de que las lipoproteínas de bajo peso molecular interaccionan con la membrana y modifican su permeabilidad, lo que protegería al espermatozoide (Holt, 2000). Sin embargo, Bathgate *et al.*, (2006) atribuyen el papel protector al alto contenido de colesterol de la yema de huevo de gallina, y no a su diferente composición fosfolipídica.

El efecto beneficioso de la inclusión de colesterol se ha observado en varias especies, como en bovino (Purdy y Graham, 2004; Mocé y Graham, 2006), caprino (Tomás *et al.*, 2008) y equino (Moore *et al.*, 2005). Sin embargo, Zeng y Terada (2000 y 2001) demuestran que la eliminación de colesterol de la membrana plasmática mediante la adición de ciclodextrinas al medio de congelación, aumenta la fluidez de la membrana y consecuentemente la supervivencia de los espermatozoides porcinos congelados-descongelados.

Actualmente, se hipotetiza con otro mecanismo de protección de la yema de huevo: se cree que posee la capacidad de inhibir el efecto deletéreo que ejercen las proteínas con afinidad por la heparina sobre la membrana plasmática, pero este hecho solo ha sido probado en búfalo (Harshan *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2007).

2.1.2.3.C. Detergentes

Los detergentes se incluyeron en los protocolos de crioconservación espermática porcina en 1971 (Graham. *et al.*, 1971). Se ha observado que la adición de estos compuestos hace decrecer los daños causados por el proceso de congelación-descongelación en diferentes especies, incluyendo la porcina. (Graham *et al.* 1971; Westendorf *et al.* 1975; Peña *et al.*, 2003; Axner *et al.*, 2004), pero el efecto positivo de estos compuestos no está del todo definido.

El *Orvus es Paste* (EQUEX-STM) es un detergente sintético habitual de los diluyentes de crioconservación. Su inclusión en los medios de congelación mejora la viabilidad, motilidad, el porcentaje de acrosoma intactos y la fertilidad del semen porcino crioconservado (Graham y Crabo, 1972; Pursel *et al.*, 1978a; Graham *et al.*, 1971; Pursel *et al.*, 1978b; Buranaamnuay *et al.*, 2009). El *Orvus es Paste* solo disminuye los daños post-descongelación en presencia de la yema de huevo (Hofmo y Almlid, 1991) debido a que este detergente facilita la dispersión de los aglomerados lipídicos de la yema, modificando la estructura de las lipoproteínas, permitiendo una mejor interacción de los lípidos con la superficie de las membranas plasmáticas (Buhr y Pettit, 1996).

2.1.2.3.D. Aditivos

Numerosos estudios se han centrado en la búsqueda de alternativas en la composición de los diluyentes de congelación. Muchos de estos trabajos centran la mejora de los medios de crioprotección en la adición de diferentes aditivos a los diluyentes ya definidos, bien como un componente más o bien para disminuir la

presencia de otro. Algunos de estos estudios han demostrado que los liposomas son capaces de incorporar lípidos a las membranas de los espermatozoides fusionándose con ellas (Buhr *et al.*, 2000) y, además, con la incorporación de una mezcla adecuada de lípidos en el diluyente a través de dichos liposomas, se puede reducir significativamente la sensibilidad al enfriamiento de los espermatozoides de verraco (He *et al.*, 2001).

Otros trabajos han centrado la mejora de los diluyentes de congelación en la adición de sustancias antioxidantes a estos medios. La excesiva producción de sustancias oxígeno reactivas (ROS) durante el proceso de criopreservación (Bilodeau *et al.*, 2000) produce una disminución de la calidad de los espermatozoides descongelados, debido al estrés oxidativo (Chatterjee y Gagnon, 2001). La inclusión de compuestos con capacidad antioxidante, como el hidroxitolueno butilado, la enzima catalasa, la enzima superóxido dismutasa (Roca *et al.*, 2004 y 2005), el glutatión (Gadea *et al.*, 2004 y 2005) o el tocoferol (Breininger *et al.*, 2005) han mejorado la viabilidad, la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados y el desarrollo de embriones *in vitro*.

En la actualidad, algunas investigaciones centran la mejora de los diluyentes de congelación en la búsqueda de sustitutos de aquellos componentes químicamente no definidos, de origen animal, como la yema de huevo (Chen *et al.*, 1993; De Leeuw *et al.*, 1993; Sztejn *et al.*, 2001; Woelders *et al.*, 1997), o la eliminación total o parcial de componentes tóxicos como el glicerol. A este respecto, se ha observado que los aminoácidos ejercen un efecto protector durante la congelación-descongelación en células animales (Carpenter y Crowe, 1988; Lalonde *et al.*, 1991) y en células vegetales (Withers y King, 1979) y más concretamente la L-Glutamina, que no solo se ha observado su papel crioprotector en diversas especies (Renard *et al.*, 1996, Khelifaoui *et al.*, 2005; Trimeche *et al.*, 1996, Li *et al.*, 2003), sino que en porcino, la inclusión de una concentración de 80 mM permite reducir el nivel de glicerol de un 3% (nivel

óptimo establecido para la crioconservación de semen de porcino) a un 2%, con las consecuentes mejoras debido a la disminución de los efectos tóxicos del mismo (De Mercado *et al.*, 2009).

2.1.2.3.E. Plasma seminal

El plasma seminal no es un componente habitual de los medios de congelación. De hecho, es eliminado durante el proceso de crioconservación para congelar únicamente los espermatozoides. La eliminación del plasma seminal, puede producir una supresión, modificación y reestructuramiento de las glicoproteínas que rodean la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide, causando una disminución de la motilidad, actividad metabólica y pérdida de la capacidad fecundante (Maxwell y Johnson, 1999). Estudios anteriores demuestran un creciente interés en la utilización de plasma seminal o alguno de sus componentes (fundamentalmente proteínas) como aditivo en los diluyentes de congelación espermáticos (Graham, 1994; Aurich *et al.*, 1996; Caballero *et al.*, 2004; Barrios *et al.*, 2005; Maxwell *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2007).

Los resultados son contradictorios en cuanto al efecto beneficioso o no, de la incubación previa a la crioconservación de los espermatozoides, en plasma seminal. Hay autores que han encontrado mejoras en la resistencia de los espermatozoides al choque por frío o incluso han visto que se puede revertir el estado de capacitación espermática (Pursel *et al.*, 1973a; Aurich *et al.*, 1996; Maxwell *et al.*, 1999; Garner *et al.*, 2001; Vadnais *et al.*, 2005), y hay otros estudios en los que resulta perjudicial (Kawano *et al.*, 2004). Esta controversia entre autores puede ser debida a las variaciones encontradas en la composición del plasma seminal entre machos y entre eyaculados.

Pues dependiendo de si el plasma seminal pertenece a un macho “bueno” o “malo” congelador, afectará de manera distinta a la congelabilidad espermática (Aurich *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2007).

Por tanto la adición de plasma seminal o alguno sus componentes a los medios de criopreservación podría alargar la longevidad de los espermatozoides mediante la unión de algunos de sus factores a la membrana plasmática disminuyendo, en cierto grado, los cambios estructurales y fisiológicos que tienen lugar durante la crioconservación (Maxwell y Johnson, 1999; Barrios *et al.*, 2000).

2.1.2.4. Fertilidad y prolificidad del semen crioconservado

Como se ha explicado anteriormente son muchas y justificadas las razones para el uso del semen congelado. Sin embargo, en la actualidad su baja aplicación se debe a la menor tasa de fertilidad y prolificidad que se obtiene en comparación con dosis de semen fresco. Mientras que, en otras especies como el vacuno, la inseminación artificial con semen crioconservado ha conseguido altas tasas de fertilidad, en el caso del porcino la situación es muy diferente. Cuando se ha utilizado semen congelado-descongelado en granjas comerciales, las tasas de fertilidad y prolificidad son de un 20 y 30% menores que con el semen fresco y 2-3 lechones menos por parto, respectivamente (Polge *et al.*, 1970; Graham *et al.*, 1971; Johnson *et al.*, 2000). Las diferencias encontradas entre especies se relacionan con una mayor o menor sensibilidad del espermatozoide al proceso de congelación, relacionada con sus características fisiológicas y bioquímicas, así como con su capacidad fecundante y de transporte por el tracto genital de la hembra (Johnson *et al.*, 2000).

Entre los factores que más afectan a la baja fertilidad y prolificidad, destacan el reducido porcentaje de espermatozoides vivos y móviles post-descongelación, reduciéndose al 50% los espermatozoides que sobreviven después de la congelación (Johnson *et al.*, 2000). Esta pérdida de movilidad y viabilidad se asocia a los daños que sufren las membranas plasmáticas durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación (Watson, 1995; White 1993), así como a procesos de “envejecimiento prematuro” de la célula, por los cuales los espermatozoides considerados como viables tienen limitada su vida en el tiempo o incluso pierden su capacidad fecundante (Watson, 1995; 2000).

La capacidad funcional post-descongelación es 10 veces menor que la del semen fresco/refrigerado (Waberski *et al.*, 1994), y la vida media fecundante de los espermatozoides es óptima entre 8 horas antes y 4 horas después de la ovulación en la hembra (Bolarín *et al.*, 2006), por lo tanto, teniendo en cuenta que la vida media funcional de los espermatozoides congelados-descongelados en el interior del aparato genital de la cerda es limitada (aproximadamente unas 6 horas, Waberski *et al.*, 1994), sincronizar el momento de la inseminación con el de la ovulación garantizaría resultados de fertilidad más satisfactorios (Roca *et al.*, 2006).

A todo esto se debe sumar que para alcanzar tasas similares a las de fecundación con semen fresco, es necesario aumentar la concentración espermática por dosis seminal, y/o realizar inseminaciones más profundas cerca de la unión útero-tubárica (Roca *et al.*, 2003) El uso de un mayor número de espermatozoides por dosis de inseminación (5 y 6×10^9 espermatozoides por dosis frente, a 3×10^9 que se utiliza de forma habitual en las dosis de semen fresco), reduce la rentabilidad de los verracos, ya que para producir el mismo número de dosis que con semen fresco/refrigerado, son necesarios el doble de eyaculados.

2.1.3. Estrategias para mejorar la viabilidad, fertilidad y prolificidad de los espermatozoides crioconservados porcinos.

Como se ha comentado anteriormente, el uso del semen crioconservado en la especie porcina, no es práctico a nivel industrial. Las razones atañen a causas económicas y productivas, ya que los resultados de fertilidad y prolificidad son más bajos que con el semen fresco refrigerado (Polge *et al.*, 1970; Graham *et al.*, 1971), y su rentabilidad es más baja, (en cuanto a número de dosis obtenidas con respecto a la utilización de dosis seminales refrigeradas a 15°C). Además, los avances en las técnicas de congelación espermática en porcino han sido más bien limitados; debido en gran parte al buen funcionamiento del uso del semen fresco refrigerado, que ha desplazado al semen congelado a un papel secundario.

Sin embargo, en la actualidad, existe una mayor valoración de las posibilidades que entraña la crioconservación espermática en los programas de inseminación artificial, sobre el semen fresco. Principalmente, debido al ilimitado periodo de conservación del semen congelado, frente a los 5-7 días de conservación, como máximo, del segundo. Esta cualidad fomentaría la introducción del semen congelado en el comercio internacional de dosis seminales, un mayor aprovechamiento de los verracos seleccionados genéticamente, la creación de bancos de semen para conservar líneas genéticas o para almacenar suficientes dosis para abastecer las necesidades de las explotaciones. También permitiría una mejor gestión de los centros de inseminación, al rentabilizar y optimizar el trabajo, fabricando dosis que permanecerían con su calidad inalterada en el tiempo, y que podrían aprovecharse en épocas poco productivas,

problemas sanitarios o en la producción del centro de inseminación, o simplemente poder ser almacenadas en los periodos que no sean necesarias.

Hoy día son pocos los científicos que investigan como mejorar la calidad del semen congelado de porcino, pero los que lo hacen centran sus investigaciones en mejorar la crioconservación espermática porcina profundizando en aspectos biofísicos, bioquímicos y fisiológicos de los espermatozoides y del proceso de congelación. Como objetivos finales se buscan los siguientes: identificar las diferencias entre verracos en cuanto a su congelabilidad (Hernández, 2007), optimizar los protocolos de crioconservación porcina, mejorando la viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados y por último desarrollar nuevas técnicas de aplicación de la dosis seminal en el aparato genital de la hembra, para garantizar un número adecuado de espermatozoides fecundantes en el momento de la ovulación (Bolarín *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2010).

2.1.3.1. Congelabilidad espermática porcina

En los espermatozoides de porcino existe una variabilidad individual en lo que a su resistencia al proceso de crioconservación se refiere (Larsson y Einarsson, 1976; Reed, 1985; Hernández, 2007). Esta variabilidad viene dada por muchos aspectos, algunos de ellos desconocidos y poco estudiados (Joyal *et al.*, 1986), pero se ha podido comprobar por diversos trabajos que el factor verraco influye en la congelabilidad de los eyaculados, situación que hace que asumamos que los verracos se puedan clasificar como “buenos” o “malos” congeladores (Watson, 1995; Thurston *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2007).

Esta clasificación entre “buenos” y “malos” congeladores es determinada de forma habitual de acuerdo con dos características espermáticas: la motilidad y la integridad de la membrana plasmática. Pero, a pesar de que estas dos cualidades son muy importantes, en ocasiones no son suficientes, ya que se ha observado que verracos clasificados como “buenos” congeladores no obtienen óptimos porcentajes de fecundación *in vitro* (Gil *et al.*, 2005). Esto hace necesaria la búsqueda de nuevas pruebas para evaluar la funcionalidad espermática y que permitan una mejor clasificación por congelabilidad. Entre estas pruebas se ha estudiado el grado de estabilidad de la cromatina, ya que la integridad del ADN de los espermatozoides porcinos puede verse afectada por el proceso de crioconservación (Cordova *et al.*, 2002; Fraser y Strzezek, 2007). Además, recientemente, se ha observado que los espermatozoides de “buenos” congeladores, son menos susceptibles a la desnaturalización del ADN que los “malos” congeladores, aunque algunos autores afirman que el daño sobre el ADN causado por el proceso congelación/descongelación tiene escasa significación biológica (Hernández *et al.*, 2006).

Las diferencias existentes en congelabilidad, entre individuos de una misma raza, parecen tener un origen genético. Esto ha sido demostrado en la especie porcina por Thurston *et al.*, (2001), que no solo determinan las diferencias entre machos sino que postulan que podrían estar relacionadas con el proceso de la espermatogénesis. Sin embargo, se desconoce cómo dichas diferencias genéticas se pueden relacionar con la congelabilidad. Estas diferencias podrían estar representadas tanto por una distinta composición lipídica o proteica de la membrana espermática, como por variaciones en la composición del plasma seminal o funcionalidad de las glándulas accesorias (Holt *et al.*, 2005).

Se ha observado que las diferencias en la calidad espermática post-descongelación solo se dan en los espermatozoides del eyaculado y no de los procedentes del epidídimo (Rath y Niemann, 1997). Esto hace pensar que el plasma seminal puede ser un factor determinante en dichas diferencias, ya que la adición de plasma seminal procedente de “buenos” congeladores mejora los parámetros post-descongelación en varias especies (Aurich *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2007). La composición proteica del plasma seminal difiere entre individuos de una misma especie (Strzezek *et al.*, 2005); y en algunas especies se han visto diferencias, entre eyaculados que presentan una buena o mala calidad espermática a la descongelación, en el perfil proteico del plasma seminal (Jobim *et al.*, 2004; Zahn *et al.*, 2005). Por tanto, el conocimiento del factor que se correlaciona con la congelabilidad en la especie porcina resultaría clave para la mejora de la calidad espermática post-descongelación.

2.1.3.2. Optimización de los protocolos de crioconservación

De entre los métodos que se intentan optimizar cabe destacar: el uso de nuevos sistemas de envasado y la mejora en los diluyentes de congelación.

2.1.3.2.A. Geometría de congelación

En 1975, se desarrollaron, simultáneamente en Alemania (Westendorf *et al.*, 1975) y Estados Unidos (Pursel y Johnson 1975), dos métodos de congelación que podían ser aplicados a nivel comercial. Pursel y Johnson (1975) colocaban las muestras seminales sobre nieve carbónica para congelarlas en forma de píldoras (pellets), que posteriormente eran almacenadas en crioviales. Este sistema dejó de usarse, a pesar de

ser un método simple y económico, ya que con él se obtenían peores rendimientos en fertilidad respecto a los obtenidos con otros tipos de envases (Larsson *et al.*, 1976; Torretta *et al.*, 1996). Por su parte, Westendorf *et al.*, (1975) comenzaron a usar como sistema de envasado macro-pajuelas de 5 - 6 mL, donde en una sola pajuela se envasaba el mínimo número de espermatozoides necesario para una inseminación ($5 - 6 \times 10^9$ espermatozoides). El problema de este envase era que, debido a su diámetro (6 mm), la congelación de los espermatozoides en su interior no era homogénea (Ekwall *et al.*, 1996) y los espermatozoides de la superficie se congelaban más rápidamente que los del centro, siendo por tanto el proceso de deshidratación diferente entre ambas zonas, con el consecuente daño celular. Posteriormente se comenzó a utilizar la pajuela de 0,5 mL en porcino (Fiser y Fairfull, 1990), usada ya con éxito en otras especies y que permite una congelación homogénea de todo el volumen; el inconveniente de este sistema es que su menor capacidad la hace poco práctica a nivel comercial.

En la última década, apenas se ha investigado nuevos sistemas de envasado. Algunos, como el sistema denominado FlatPack® (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000), ha demostrado una alta eficacia, permitiendo almacenar los espermatozoides necesarios para una dosis en un solo envase y, debido a su reducido diámetro (0.75 mm), garantizar una congelación y descongelación uniforme mejorando la viabilidad y fertilidad *in vivo* (Eriksson *et al.*, 2001 y 2002).

2.1.3.2.B. Mejora en los diluyentes de conservación

La mejora de los diluyentes se centra en adecuar los medios de dilución a las características biofísicas y bioquímicas propias de los espermatozoides. Se sabe que la pérdida de fertilidad de los espermatozoides crioconservados es debida a la alteración

estructural y funcional de las membranas (Watson, 1995; Pettit y Buhr, 1998), de tal manera que los cambios en la composición y la dinámica de los lípidos de membrana se asocian a un “envejecimiento prematuro” del espermatozoide (Buhr *et al.*, 1994; Pettit y Buhr 1998), por el cual, aunque la célula sea viable, tiene una vida limitada y una capacidad fecundante reducida.

Se sabe que durante el proceso de congelación aumentan los ácidos grasos poliinsaturados (Buhr *et al.*, 1994) y disminuye el colesterol (Cerolini *et al.*, 2001). El aumento de los ácidos grasos poliinsaturados hace que las membranas de los espermatozoides de porcino sean más susceptibles al proceso de peroxidación lipídica. Este proceso ocurre debido a la exposición de las células a compuestos oxígeno-reactivos, producidos por espermatozoides dañados y/o muertos (Aitken, 1995; Maxwell y Stojanov, 1996). De forma natural, el plasma seminal tiene antioxidantes que los neutralizan (Watson, 1990), pero el protocolo actual de crioconservación para semen de verracos elimina por completo este plasma seminal y, por consiguiente hace que los espermatozoides estén más expuestos a los fenómenos de peroxidación lipídica durante la congelación.

Hoy día, los estudios realizados para frenar este “envejecimiento prematuro” se centran en la adición a los medios de congelación actuales de sustancias que eviten o minimicen todo este proceso, ya sea mediante la incorporación de lípidos a las membranas (Buhr, *et al.*, 2000; He *et al.*, 2001), la adición de antioxidantes a los medios de congelación (Roca *et al.*, 2004; Roca *et al.*, 2005), o la adición de plasma seminal como un agente protector más (Hernández *et al.*, 2007).

2.1.3.3. Mejoras en las técnicas de inseminación con semen crioconservado

En la actualidad los métodos de inseminación artificial se han ido adecuando para el uso del semen crioconservado, mejorando los bajos resultados de fertilidad y prolificidad que se obtenían frente al semen fresco (Johnson *et al*, 2000). Las dos vertientes que se han desarrollado para mejorar los procedimientos de inseminación son el depósito de los espermatozoides lo más cerca posible de la unión útero-tubárica y la sincronización del momento de la inseminación con el de la ovulación.

2.1.3.3.A. Implantación de los espermatozoides en el tracto de la hembra

Dependiendo del lugar de implantación de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra, los resultados de fertilidad usando semen congelado-descongelado pueden variar, ya que la vida de estos espermatozoides es limitada.

En el caso del porcino existen cuatro posibles técnicas de inseminación según el lugar de depósito de los espermatozoides:

1) Inseminación tradicional: este método utiliza el catéter Melrose realizando dos inseminaciones transcervicales por cerda, con dosis que tienen una concentración entre $2.5-4 \times 10^9$ espermatozoides por dosis, en 70-100 mL de volumen.

2) Inseminación post-cervical, por la cual se deja en la parte posterior del cérvix, y se deposita la dosis seminal en el cuerpo del útero. Este método ha dado muy buenos resultados con el uso de semen fresco y congelado (Watson y Behan, 2002; Vázquez *et*

al., 2008; Casas *et al.*, 2010), consiguiendo reducir el número mínimo de espermatozoides necesarios por dosis a 1×10^9 .

3) La inseminación intra-uterina profunda, la cual, ya sea por endoscopia o mediante el uso de una sonda flexible (Martínez *et al.*, 2002), es capaz de atravesar el cérvix y alcanzar la profundidad del cuerno uterino, dónde los espermatozoides serán depositados. Mediante esta técnica se han alcanzado resultados óptimos de fertilidad y prolificidad con 1×10^9 espermatozoides congelados/descongelados por dosis (Roca *et al.*, 2002).

4) La implantación cerca de la unión útero-tubárica mediante vía quirúrgica (Sánchez *et al.*, 1987) o laparoscopia, permite disminuir hasta 100 veces el número de espermatozoides necesarios para la fecundación (Kruger y Rath, 2000). Y a pesar de ser un método invasivo, y complicado de realizar es muy útil cuando se parte de pocos espermatozoides o dosis muy deterioradas.

2.1.3.3.B. Sincronización del momento de inseminación con el de ovulación

Los espermatozoides crioconservados, tras su descongelación e implantación en el tracto genital de la cerda, tienen una vida media con capacidad fecundante muy reducida, que no supera las 6-8 horas (Waberski *et al.*, 1994).

La ovulación de la cerda se produce entre las 35 y 45 horas después del inicio del estro; sin embargo, existe una gran variabilidad entre cerdas, y puede llegar a oscilar entre 10 y 58 horas (Revisado por Soede *et al.*, 2000). Debido a esta gran variabilidad es necesario un control exhaustivo de la detección del celo, ya sea visualmente (inflamación y enrojecimiento de la vulva, cambio de textura del flujo vaginal y reflejo

de inmovilidad provocado por la presencia del verraco o por presión sobre el lomo por un operario) o mediante ecografía (Roca *et al.*, 2002).

Predecir el momento de ovulación, de manera sencilla y rápida, permitiría una mejor utilización del semen congelado-descongelado, el cual tiene una vida más limitada que el semen fresco.

2.1.4. Congelación de semen en cerdo Ibérico

Los estudios realizados en el cerdo Ibérico a nivel reproductivo son escasos (Pérez, *et al.*, 1988; Marigorta, *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2009; González-Bulnes *et al.*, 2010), de forma general los trabajos de investigación en cerdo ibérico se centran en parámetros productivos (Nieto *et al.*, 2002), calidad de la carne (Narváez-Rivas *et al.*, 2007), enfermedades (Espí *et al.*, 2008) o genética (Fernández *et al.*, 2008).

La mayoría de los cerdos ibéricos criados en España son producidos en un sistema de producción extensivo. Donde la recuperación seminal e inseminaciones de las cerdas resultan complicadas de elaborar.

El bajo interés por la conservación del semen y la inseminación artificial en porcino Ibérico, ha relegado la investigación en reproducción en esta especie a trabajos centrados en la conservación de variedades locales, como medio de conservación de recursos zoogenéticos (Peinado *et al.*, 1998; Poto *et al.*, 2000).

En la actualidad la técnica de conservación para semen de cerdo Ibérico se basa en las recomendaciones de la FAO (1998) y en la técnica de crioconservación de espermatozoides porcinos propuesta por Thilmant en 1997. Esta técnica ha obtenido resultados de fertilidad del 80% y una prolificidad de 10-11 lechones por parto, para

razas especializadas y de uso intensivo en la producción animal (Thilmant 1997; 2001); siendo adaptada con pequeñas modificaciones para razas autóctonas francesas (Busslére *et al.*, 2000) y españolas (Serenó *et al.*, 2003).

De forma general en todas las técnicas de congelación de semen se siguen los siguientes pasos:

- 1) Recolección del semen, recuperando solo la fracción rica del eyaculado.
- 2) Dilución en un medio de conservación hasta el momento del procesamiento.
- 3) Descenso de la temperatura de recogida hasta 15°C en un tiempo de 2 horas.
- 4) Centrifugación del semen para la eliminación del plasma seminal y el medio de conservación, y la concentración de los espermatozoides.
- 5) Resuspensión de los espermatozoides en el medio de congelación I, que tendrá un crioprotector no penetrante (Glucosa, Lactosa, Fructosa...) y un agente protector contra el choque frío que será la yema de huevo.
- 6) Descenso de la temperatura de 15°C hasta los 5°C en 2 horas ó 2 horas y media.
- 7) Dilución en el medio de congelación II, de igual composición que el medio I, pero que además incorpora el crioprotector penetrante (glicerol) y un compuesto surfactante (*Orvus es Paste*).
- 8) Envasado y congelación con biocongelador o sobre vapores de nitrógeno.

La mayor diferencia observada en la técnica recomendada para la conservación de recursos zoogenéticos (FAO, 1998), y en concreto para el semen de cerdo Ibérico (Serenó *et al.*, 2003), respecto a otras más estandarizadas en la investigación porcina (Westendorf *et al.*, 1975; Pursel y Johnson, 1975), es la composición del diluyente de congelación. Entre las diferencias cabe destacar el uso de fructosa como crioprotector no penetrante y el uso del detergente *Orvus es Paste*. En esta técnica el detergente no

solo se incorpora en el medio II sino también se incorpora en el medio I durante el enfriamiento de 15 a 5°C.

La falta de investigaciones entorno a la congelación del semen de cerdo Ibérico y la creciente necesidad de su uso para la conservación de los recursos zoogenéticos autóctonos, hace necesario un mayor número de estudios centrados en esta raza, tanto en cuanto a parámetros de congelación, como en métodos de mejora y determinación de la congelabilidad de los machos, para una mejor selección de los animales que van a ser incluidos en los bancos de crioconservación de material zoogenético.

2.2. EL ESPERMATOZOIDE DE PORCINO

2.2.1. El espermatozoide

La célula espermática de porcino está estructurada en cabeza, parte intermedia y cola (**Figura 1**). La cabeza de forma oval, contiene el acrosoma y el núcleo; el acrosoma situado en la región apical, es una vesícula que contiene enzimas como acrosina, la arilsulfatasa y la β -N-acetilhexasaminidasa e hialuronidasa, enzima cuya función principal es disgregar las células que componen la corona radiada del ovocito durante el proceso de fecundación. El núcleo ocupa la práctica totalidad de la cabeza y contiene el ADN del espermatozoide, está altamente condensado y es transcripcionalmente inactivo, la compactación que sufre se debe a proteínas específicas llamadas protaminas que se interpone y une a las cadenas de ADN.

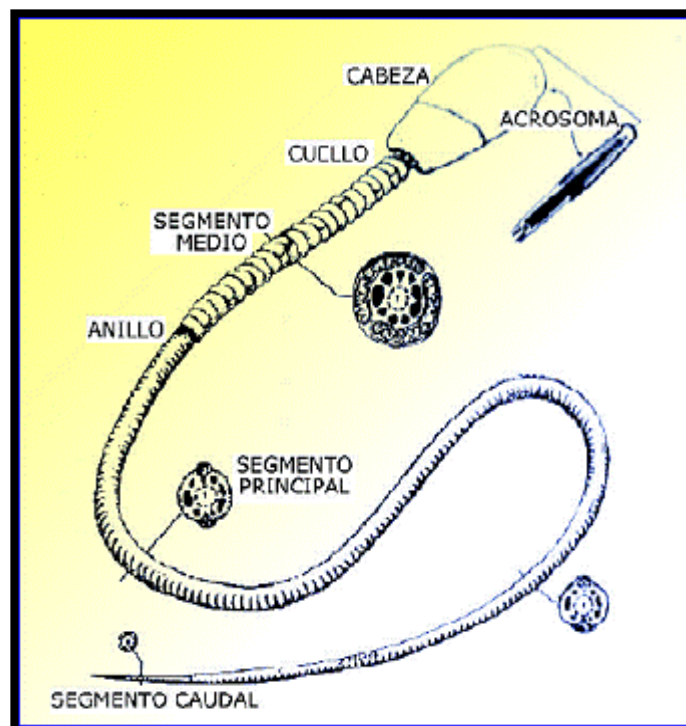


Figura 1. Esquema de las partes de un espermatozoide

En la parte intermedia contiene la vaina mitocondrial, un cilindro de mitocondrias que envuelven el primer tercio del flagelo y une con el plasmalema. Tiene como función proporcionar energía al espermatozoide para el movimiento (Robl y Fissore, 1999).

La cola o flagelo contiene el axonema, una estructura constituida por 9 pares de microtúbulos periféricos y 1 par central (9+2) (**Figura 2**), esta estructura proporciona movilidad a la célula, y su composición es diferente a los flagelos de células eucariotas y procariotas (Millette, 1999).

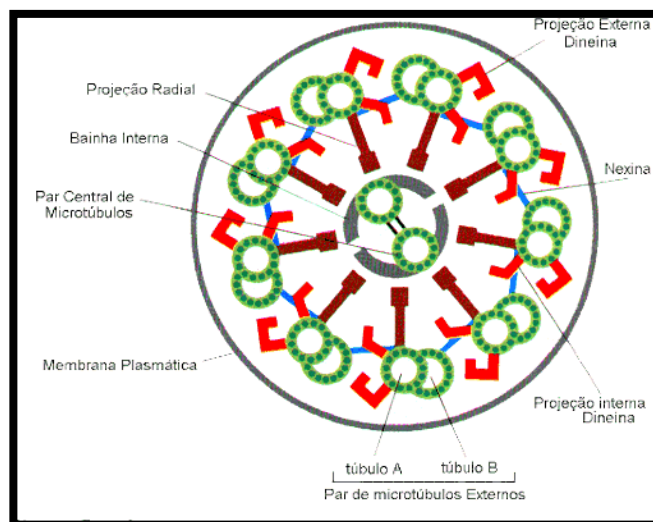


Figura 2. Corte transversal de la cola del espermatozoide

2.2.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de diferenciación celular por el cual una célula germinal se transforma en espermatozoide con todas sus estructuras. Este proceso está controlado endocrinológicamente por el eje hipófisis-hipotálamo-testículo y en la especie porcina dura entre 25-26 días (Pinart *et al.*, 2000).

La diferenciación de célula germinal a espermatozoide se desarrolla en tres fases: proliferación, meiosis y espermiogénesis.

En la fase de proliferación, las células germinales se transforman en espermatogonias, a partir de las cuales se producen dos espermatocitos. Estos sufrirán un proceso de meiosis para así obtener cuatro espermátidas haploides genéticamente diferentes y portadoras del cromosoma sexual X e Y dos a dos. Finalmente, estas espermátidas van a sufrir el proceso de espermiogénesis, fase de diferenciación celular en la que la célula sufrirá un conjunto de modificaciones que le llevará a diferenciarse en un espermatozoide.

Entre estas transformaciones destacan la formación del acrosoma a partir del aparato de golgi, desarrollo del flagelo, elongación del núcleo, condensación de la cromatina, reorganización del citoplasma y de los orgánulos celulares (Pinart *et al.*, 2001), y pérdida del contenido citoplasmático no necesario (Hess, 1999; Oko y Clermont, 1999); desplazándolo hacia la pieza terminal de la cola originando la llamada gota citoplasmática rodeada por membrana plasmática.

El proceso termina con la liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero (Robl y Fissore, 1999).

2.2.3. Maduración

Los espermatozoides una vez abandonan los testículos deben atravesar el epidídimo hasta el conducto deferente. Durante esta travesía la célula sufrirá una “maduración epididimaria”, donde los espermatozoides adquirirán motilidad progresiva y la capacidad de interactuar con el gameto femenino para poder fecundarlo (Yanagimachi, 1988; 1994). Todos estos cambios producidos durante la maduración en el epidídimo se atribuyen a interacciones con las secreciones específicas del epitelio epididimario, en las distintas regiones del mismo (Cooper *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 2000).

En la especie porcina el proceso de maduración de los espermatozoides dura 10 días, pudiendo llegar a permanecer de 4 a 7 días almacenados en la cola del epidídimo antes de ser eyaculados (Geisert, 1999).

Entre las modificaciones provocadas durante maduración epididimaria cabe destacar tres:

1) La adquisición y desarrollo de la motilidad (Briz *et al.*, 1995). Los espermatozoides procedentes de los testículos poseen escasa o nula motilidad por falta de maduración de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994). El incremento de la motilidad que se produce en el epidídimo parece ser debido a cambios en la composición intracelular del espermatozoide, inducido por diferentes proteínas presentes en el mismo que van a actuar directamente sobre el flagelo (Brokaw, 1987).

2) Modificaciones en la membrana plasmática, entre las cuales destacan distintas alteraciones físico-químicas de los lípidos de la membrana del espermatozoide (Wolf *et al.*, 1988), dando lugar a cambios en el patrón de distribución de las proteínas (Suzuki, 1990), insertándose nuevas proteínas sintetizadas en el epidídimo y perdiendo o redistribuyéndose proteínas de origen testicular (Blobel *et al.*, 1990; Gatti *et al.*, 1999). Además en el epidídimo se sintetiza una gran cantidad de colesterol (Suzuki, 1990), lo que lleva a pensar que éste puede jugar un papel importante en el proceso de maduración (Parks y Hammerstedt, 1985). Como resultado final de todas estas modificaciones en la membrana plasmática de los espermatozoides, éstos adquieren la capacidad de reconocer y unirse al ovocito (Kumar *et al.*, 1991; Cooper, 1986).

3) Migración de la gota citoplasmática. En la especie porcina, durante el tránsito del espermatozoide por el cuerpo del epidídimo se produce el desplazamiento de la gota citoplasmática (Harayama y Kato, 1992), liberándose posteriormente durante la eyaculación (Kato *et al.*, 1996). La eliminación de la gota citoplasmática resulta

fundamental, ya que aquellos que no la pierdan no habrán concluido fisiológicamente su maduración y no serán sensibles al efecto del bicarbonato, indispensable para que el espermatozoide se capacite en el tracto de la hembra, sufra el proceso de reacción acrosómica y así finalmente sea capaz de penetrar un oocito y fecundarlo (Gadella y Van Gestel, 2004).

2.2.4. Eyaculado

Durante la eyaculación los espermatozoides van a entrar en contacto con las secreciones de las glándulas accesorias (plasma seminal). En este plasma seminal existen glicoproteínas con capacidad decapacitante, que evitarán la capacitación prematura del espermatozoide, adquiriendo la capacidad fecundante al paso por el tracto genital de la hembra (Töpfer-Petersen *et al.*, 1995)

El eyaculado del verraco consta de tres partes o fracciones: la fracción pre-espermática constituida fundamentalmente por plasma seminal de aspecto transparente, la fracción rica o espermática de aspecto lechoso, con una elevada concentración de espermatozoides y por último la fracción post-espermática también de color blanquecino, pero casi transparente debido a la gran cantidad de plasma seminal que contiene, con pocos espermatozoides pero abundantes corpúsculos gelatinosos denominados comúnmente como “tapioca” procedentes de las glándulas de Cowper. Estos corpúsculos se liberan durante todo el eyaculado pero es en esta parte final donde existe mayor liberación y su función es sellar el cérvix de la hembra evitando el reflujo del eyaculado del verraco (Geisert, 1999).

2.2.5. Composición de la membrana plasmática

De forma general y al igual que el resto de las células, la membrana del espermatozoide posee una estructura en mosaico fluido, formada por una doble capa de fosfolípidos, proteínas unidas no covalentemente y glúcidos unidos covalentemente a los lípidos o a las proteínas, constituyendo una estructura dinámica donde la mayoría de sus componentes pueden desplazarse por el plano de la membrana.

La composición química de la membrana plasmática varía entre las distintas células del organismo, dependiendo de la función o del tejido en la que se encuentren, de esta manera la composición de la membrana plasmática del espermatozoide difiere de la de otras células somáticas, tanto en su composición como en sus características biofísicas.

A diferencia del resto de las células somáticas, la membrana del espermatozoide está dividida en regiones o dominios, que difieren entre ellos tanto en estructura como en composición, y cada uno de los cuales tendrá una función determinada a lo largo de la vida de la célula (Wolf, 1995).

2.2.5.1. Glicocáliz

Son moléculas ricas en carbohidratos unidas covalentemente a los lípidos o a las proteínas de la membrana, pero su función no está del todo clara. Parece tener relación con la unión a la zona pelúcida del ovocito durante la fecundación (Schröter *et al*, 1999) e inmunoprotección del espermatozoide en el tracto genital de la hembra.

La formación de las glicoproteínas que lo componen, se realiza en el testículo, en los epitelios de los conductos deferentes y el epidídimo, asociándose al espermatozoide a

través del tránsito de éste por los distintos conductos y durante su almacenamiento en el epidídimo.

2.2.5.2. Lípidos

Los lípidos de la membrana del espermatozoide conforman la estructura principal de la membrana, formando la bicapa lipídica. Aunque existen diferencias en el tipo de lípidos que conforman las membranas de los espermatozoides de las diferentes especies domésticas, de forma general los más abundantes son los fosfolípidos seguidos de los lípidos neutros, siendo lo más minoritarios los glicolípidos (Gadella y Harrison, 2000).

2.2.5.2.A. Fosfolípidos

Tienen un papel muy importante en la funcionalidad de las membranas celulares. Los fosfolípidos están compuestos de una molécula de glicerol unida a dos moléculas de ácidos grasos y a un grupo fosfato, este último combinado con un compuesto orgánico. Se trata de moléculas anfipáticas porque poseen un extremo hidrofílico (glicerol y base orgánica) y otro hidrofóbico (ácido graso). Esta propiedad anfipática de los fosfolípidos es la que origina la estructura en bicapa lipídica de la membrana. Dos capas de moléculas de fosfolípidos se sitúan de manera que sus extremos hidrosolubles o hidrófilos se orientan hacia el exterior celular y sus extremos hidrófobos hacia el interior celular.

En la membrana de los espermatozoides los fosfolípidos difieren mucho entre especies, en el porcino los mayoritarios son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la esfingomielina (**Tabla 1**).

Tabla 1. Porcentaje de fosfolípidos de la membrana de espermatozoides de diferentes especies (White y Darin-Bennett, 1976).

Fosfolípido	Morueco	Toro	Verraco	Conejo	Perro	Gallo	Hombre
Esfingomielina	11,4	10,5	12,6	23,4	18,3	13,1	21,4
Fosfatidilserina	1	1,8	2,4	2,5	3,6	8,9	2,7
Fosfatidilinositol	ND	ND	ND	3,3	2,7	1,6	1,9
Colina	40,8	44,8	9,8	14	3,6	7,8	2,7
Fosfatidilcolina	17,3	15,5	37,4	28,7	27,5	39,6	28,8
Etalonamina	5,9	5,5	10,8	8,3	15,3	5,2	9,4
Fosfatiletanolamina	5,6	3,5	13,5	8,2	20,1	8,5	21,6
Cardiolipina	5,6	3,4	3	2,7	3	1,7	1,6
Otros lípidos	12,4	15	10,5	6,2	6,6	10,7	7,39

Cantidades están expresadas en porcentaje de fosfolípidos totales extraídos por cada 10⁹ espermatozoides. ND = no detectado o cantidades inferiores al 1%.

En los espermatozoides de porcino, así como en otras especies, la distribución de los diferentes fosfolípidos se realiza de una forma asimétrica, observándose como la fosfatidilcolina y la esfingomielina se dispone principalmente en la capa externa, y la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina en la capa interna (Müller *et al.*, 1994; Nolan *et al.*, 1995; Gadella *et al.*, 1999).

La correcta ordenación de los fosfolípidos en la membrana se lleva a cabo por varias enzimas fosfolípidotransferasas (Bervers *et al.*, 1998), capaces de mover los diferentes fosfolípidos de la cara interna a la externa y viceversa.

2.2.5.2.B. Lípidos neutros

La composición en lípidos neutros en la membrana difiere no solo entre especies sino también entre individuos de una misma especie. Uno de los lípidos neutros que más relevancia tiene en la composición de la membrana es el colesterol.

La relación entre la cantidad de colesterol y fosfolípidos es fundamental para la estabilidad de la membrana espermática (Parks y Hammerstedt, 1985), de esta manera, se ha relacionado la mayor susceptibilidad al choque térmico de los espermatozoides porcinos con una menor relación colesterol:fosfolípidos, que resulta en cambios de transición de fase líquido-gel a mayores temperaturas durante el enfriamiento (Parks y Lynch, 1992, Drobnis *et al.*, 1993, White, 1993, Brouwers *et al.*, 2005). También se sabe que la pérdida de colesterol disminuye la fluidez de la membrana y se correlaciona con una mayor mortalidad post-descongelación (Cerolini *et al.*, 2001).

Esta relación de colesterol:fosfolípidos es específica para cada especie, siendo su valor alto en aquellas especies que presentan una mayor resistencia a la congelabilidad como en la especie bovina o en la especie humana, donde sus valores son de 0,4 y 0,99 respectivamente (Parks *et al.*, 1987; Darin- Bennett y White, 1977). Mientras que en especies con peor congelabilidad los valores son más bajos, como es el caso del porcino, donde este valor se sitúa en 0,2 (Parks y Lynch, 1992).

2.2.5.3. Proteínas

Las proteínas son responsables de las funciones dinámicas de la membrana, por lo que cada membrana tienen una dotación muy específica de proteínas, y al igual que en los lípidos el porcentaje de proteínas diferirá mucho entre células.

Las proteínas de membrana del espermatozoide se sintetizan en el testículo después de la espermiogénesis, durante la maduración en el epidídimo, o durante la eyaculación.

Las proteínas integradas en la membrana del espermatozoide participan en funciones como el transporte de calcio al interior de la célula, que se requiere para varias funciones de la capacitación espermática, como la hipermotilidad (Carlson *et al.*, 2003),

reacción acrosómica (Darszon *et al.*, 2006), y linealidad o progresión del movimiento espermático (Sakata *et al.*, 2002). Alteraciones en estas proteínas transportadoras pueden causar el aumento excesivo de calcio intracelular y una consecuente infertilidad por deterioro en la motilidad espermática (Okunade *et al.*, 2004). El proceso de congelación puede producir la eliminación o modificación de las proteínas que rodean la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide resultando en la disminución de la motilidad, actividad metabólica y pérdida de la capacidad fecundante (Maxwell y Johnson, 1999).

2.3. PLASMA SEMINAL

El plasma seminal es un medio líquido en el cual se encuentran inmersos los espermatozoides tras la eyaculación. Está constituido por una mezcla de secreciones procedentes de los testículos, del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales; Mann y Lutwak-Mann, 1981).

El plasma seminal es un fluido complejo, formado principalmente por compuestos inorgánicos y orgánicos, entre los que se encuentran aminoácidos, ácidos grasos, iones inorgánicos, ácido cítrico, carbohidratos, sales orgánicas, prostaglandinas y proteínas de bajo y alto peso molecular (Mann y Lutwak-Mann, 1981). El conjunto formará un medio tampón, que mantendrá una presión isosmótica y un pH entorno a 7. El plasma seminal contiene factores que afectarán al tracto genital femenino (Yanagimachi, 1994; Johnson, 2000), y prostasomas (Piehl *et al.*, 2006) que son orgánulos ricos en colesterol y fosfolípidos, relacionados con la estabilización de las membranas y la prevención de la capacitación y la reacción acrosómica (Arienti *et al.*, 1997). Sin embargo, son las proteínas las que en último término influirán determinantemente en la regulación de la

mayor parte de las funciones espermáticas y por tanto en la fertilidad (Lavon y Bournsell, 1971).

El plasma seminal actúa como regulador no solo de los procesos espermáticos, sino también a nivel de la fecundación y del tracto genital de la hembra. Sirve de vehículo de transporte y de soporte metabólico para los espermatozoides durante su travesía por el tracto genital de la hembra (Maxwell *et al.*, 2007). Además proporciona protección, regula la motilidad, la capacitación y el reconocimiento y unión entre gametos (Johnson *et al.*, 2000).

2.3.1. Formación y funciones de los componentes del plasma seminal

La formación de los diferentes componentes del plasma seminal se producirá según se desarrolle el proceso de maduración del espermatozoide.

De esta manera, los primeros componentes que actuarán sobre el espermatozoide serán los producidos en el epidídimo. Durante el tránsito del espermatozoide por esta zona, su membrana plasmática sufrirá una remodelación proteica y fosfolipídica, en la cual nuevas proteínas secretadas por el epidídimo serán integradas en la membrana espermática (Gatti *et al.*, 2004).

Por último, tras la eyaculación actuarán las distintas secreciones procedentes de la vesícula seminal, próstata y glándulas bulbouretrales. Entre los compuestos secretados por estas glándulas sexuales se encuentran metabolitos energéticos, como fructosa, inositol, ácido cítrico y ácido ascórbico (Garner y Hafez, 1993); aminoácidos tales como ácido glutámico, carnitina, taurina e hipotaurina; y también enzimas protectoras contra sustancias oxígeno reactivas (sustancias ROS), y otras que intervendrán en la digestión de los espermatozoides muertos y dañados, y en la penetración del ovocito (Strzezek,

2002). Entre los compuestos inorgánicos secretados se hallan principalmente el zinc y el calcio, que actúan como bactericidas y en la capacitación espermática respectivamente (Strzezek *et al.*, 1987).

La próstata además produce secreciones alcalinas para neutralizar las secreciones vaginales ácidas (Setchell *et al.*, 1994) y las glándulas bulbo-uretrales secretan la fracción de gel o tapioca característica del eyaculado del verraco.

Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de componentes que posee el plasma seminal, son las proteínas las que contribuyen de forma más relevante a la regulación de la mayor parte de las funciones espermáticas.

2.3.1.1. Proteínas del plasma seminal

Las principales proteínas del plasma seminal pertenecen a tres familias: proteínas ricas en cisteína, proteínas que contienen el dominio fibronectina tipo II y espermadhesinas.

- Las proteínas secretadas ricas en cisteína (CRISP) se expresan en epidídimo y testículo, y su función está relacionada con los procesos de maduración e inhibición de una capacitación espermática prematura, además de ser necesarias para la fusión del espermatozoide con el ovocito (Udby *et al.*, 2005). También parecen ser unas de las responsables de la adherencia de las células espermáticas a las células de Sertoli (Maeda *et al.*, 1999) y se ha sugerido que podrían tener alguna función en el tracto genital de la hembra (Töpfer-Petersen *et al.*, 2005).

- Las proteínas con el dominio fibronectina tipo II, se han identificado en múltiples especies, pero en porcino las denominadas pB1 son un componente minoritario dentro de las proteínas del plasma seminal (Calvete *et al.*, 1997). Estas proteínas tienen

afinidad por los fosfolípidos de membrana, tanto de la membrana de las células oviductales de la hembra (Therien *et al.*, 2005), como de la membrana espermática. Esta interacción entre proteínas y fosfolípidos de la membrana espermática estimularía la salida de fosfolípidos y colesterol de la misma, paso fundamental para el comienzo de la capacitación (Fernández-Juan *et al.*, 2006)

- La familia de las espermadhesinas son un conjunto de glicoproteínas de bajo peso molecular (12-16 kDa) que representan cerca de 75% del contenido proteico total del plasma seminal (Dostalova *et al.*, 1994). Están constituidas por 5 miembros: AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I y PSP-II. Estas espermadhesinas tienen una función bimodal, ya que son capaces de mantener estable la célula espermática hasta su llegada al oviducto (Sanz *et al.*, 1992; Töpfer-Petersen *et al.*, 1998) y una vez allí promueven la capacitación, al ser expuestas a lipoproteínas de alta densidad y glicosaminoglicanos del tracto genital de la hembra (Therien *et al.*, 1997; Manjunath y Therien, 2002).

También se ha observado recientemente que las espermadhesinas y sus agregados presentan afinidad por la manosa, pudiendo ser las responsables de la formación del reservorio oviductal en la zona de la unión útero-tubárica, ya que se ha demostrado que esta afinidad esta correlacionada positivamente con la habilidad para interactuar con el epitelio oviductal (Jelínková *et al.*, 2004; Liberda *et al.*, 2006). Por último las espermadhesinas AQN-1, AQN-3, AWN y sus agregados presentan afinidad por las cadenas de carbohidratos de la zona pelúcida, lo que sugiere que podrían estar involucradas en el reconocimiento entre gametos (Jonáková *et al.*, 2000).

2.3.2. El plasma seminal en congelación espermática

La crioconservación conlleva la eliminación del plasma seminal, lo que supone una eliminación, modificación y reestructuración de las glicoproteínas que rodean la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide y, con ello, la consecuente pérdida de motilidad y capacidad fecundante (Maxwell y Johnson, 1999).

En la actualidad se está despertando un creciente interés en la utilización de plasma seminal o alguno de sus componentes (fundamentalmente proteínas; Caballero *et al.*, 2004; Barrios *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007; Maxwell *et al.*, 2007) como aditivo de los diluyentes espermáticos, para la posible estabilización de las membranas plasmáticas de los espermatozoides durante este proceso. Debido a la capacidad del plasma seminal de aumentar la resistencia de los espermatozoides al choque térmico por frío y reducir e incluso revertir el estado de capacitación espermática (Pursel *et al.*, 1973b; Vadnais *et al.*, 2005), cabe pensar que podría eliminar o amortiguar el estado de crio-capacitación, por el cual la vida del espermatozoide se ve seriamente limitada y consecuentemente su capacidad fecundante se ve reducida. De esta manera, el plasma seminal en los medios de congelación podría alargar la longevidad de los espermatozoides mediante la unión de alguno de sus factores proteicos a la membrana plasmática; inhibiendo, en cierto grado, cambios estructurales y fisiológicos (Fraser *et al.*, 1990; Maxwell y Johnson 1999; Barrios *et al.*, 2000).

2.4. CHEMSENSOR

El “ChemSensor” es una pseudo-nariz electrónica con numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y química, en tareas de discriminación (Radovic *et al.*, 2001; Ansorena *et al.*, 2001; Landaud 2008; Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2009; Peris y Escuder-Gilabert, 2009). Se fundamenta en la utilización de un espectrómetro de gases-masas (GC-MS), unido a un software específico, que analiza el espectro que se obtiene analizando cada uno de las fracciones másicas formadas, como si fuesen respuestas de un sensor (**Figura 3**), (Busto *et al.*, 2002; Peris y Escuder-Gilabert, 2009).

El uso de esta técnica frente a la tradicional nariz electrónica tiene importantes ventajas. En primer lugar es muy reproducible, pues no depende de sensores que envejecen con el tiempo, ya que aporta la fiabilidad de la cromatografía de gases-masas. El tiempo de análisis de cada muestra es muy corto (5-10 minutos) y no necesita el acondicionamiento del sensor entre dos muestras. El número de variables utilizadas pueden ser tantas como las fracciones másicas del espectro obtenido, pudiendo ser superiores a 400. Y además, otra ventaja adicional del sensor es que permite analizar los compuestos volátiles de una muestra, pudiendo llegar a determinar cual de ellos influye mayoritariamente en la discriminación.

El funcionamiento del ChemSensor está fundamentado en la utilización del espectro de masas mediante un software adecuado, el cual suma individualmente cada una de las abundancias de las fracciones másicas obtenidas en todo el cromatograma, obteniéndose una matriz de datos con la abundancia total de cada una de las masas. Este valor total se comporta como el dato de esa variable que posteriormente puede ser tratado con un programa de quimiometría (Peris y Escuder-Gilabert, 2009).

La cantidad de información obtenida con este método es muy grande ya que cada muestra está definida en un espacio multidimensional con más de 250 variables. Para poder manipular este gran conjunto de datos es necesario recurrir a herramientas quimiométricas, como las técnicas de reconocimiento de modelos que permiten visualizar las agrupaciones naturales de las muestras. Con dichas técnicas primero se transforman los datos a una forma adecuada para los análisis posteriores, y seguidamente, esos datos pueden ser analizados mediante diversas técnicas quimiométricas, entre las más utilizadas: el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de agrupaciones (CA), los métodos de clasificación, como el SIMCA (Soft Independent Modelling Class Analogy) y el KNN (K-Nearest Neighbours), la regresión por componentes principales (PCR) y los mínimos cuadrados parciales (PLS), para análisis cuantitativos o semicuantitativos (Peris y Escuder-Gilabert, 2009).

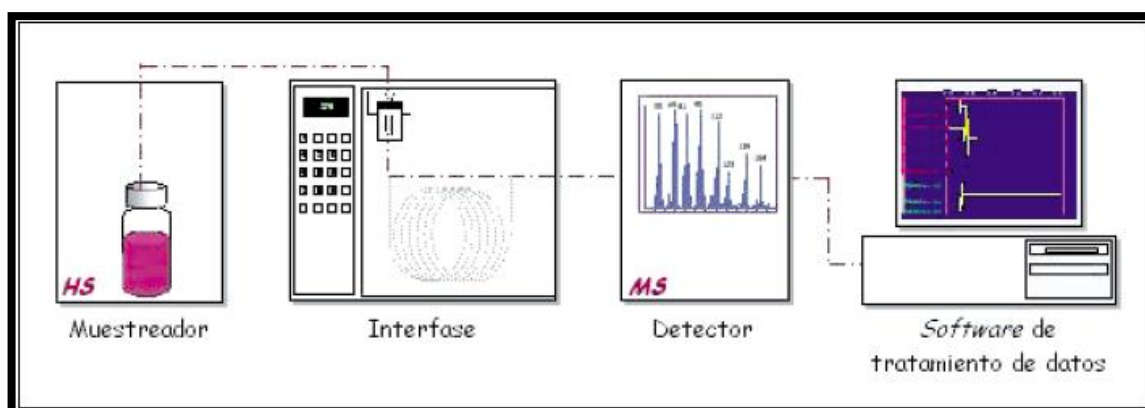


Figura 3. Esquema de funcionamiento del ChemSensor (Fuente: Busto *et al.*, 2002)

El uso combinado de este ChemSensor con la técnica de análisis SIMCA, ha sido recientemente usado por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del CSIC, como una herramienta discriminadora entre cerdos alimentados con diferentes dietas (Martín *et al.*, 2007; 2009). Las modificaciones introducidas por el equipo de trabajo del ICTAN, han permitido utilizar la totalidad de la información

aportada por el cromatograma de los ácidos grasos del detector de masas, pudiendo utilizarlo como una base para la clasificación de los cerdos según la dieta administrada previamente. Este método utiliza todos los ácidos grasos presentes en una muestra, incluso los minoritarios y los difícilmente detectables, confiriendo una mayor fiabilidad en el grado de discriminación. El tiempo de análisis es corto, similar al utilizado normalmente para el análisis de ácidos grasos. Y el número de variables que podemos utilizar para la discriminación es igual al número de fracciones másicas detectadas, pudiendo ser seleccionadas a voluntad, llegando a alcanzar cifras superiores a 250. Además, el método de clasificación SIMCA permite asignar una clasificación previa al análisis de nuestras muestras, seleccionándose así las fracciones másicas adecuadas para discriminar entre nuestros grupos, determinando un modelo matemático, en que el número de factores discriminantes dependerá del número de muestras y del número de fracciones másicas seleccionadas. Usando este método, Martín *et al.*, (2007 y 2009) observaron que los resultados obtenidos con el sensor químico, permiten discriminar de manera eficaz en base al cromatograma de ácidos grasos, cerdos que hubieran sido alimentados con dietas diferentes, a partir de muestras muy diferentes como grasa lumbar, tocino o magro de jamón curado.

Así pues, si esta técnica híbrida da la posibilidad de discriminar una muestra de un animal en función de una clasificación previa, cabría la posibilidad de poder discriminar entre muestras de semen de diferentes verracos, diferenciando entre “buenos” y “malos” congeladores, previa relación de los datos obtenidos por el sensor químico con su potencial de congelabilidad (evaluación de parámetros de calidad espermática tras la descongelación de las muestras).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Por todo lo anteriormente expuesto, los objetivos fundamentales de este trabajo son:

- 1) Estudio de diferentes parámetros bioquímicos y funcionales del eyaculado posiblemente relacionados con la congelabilidad espermática.
- 2) Diferenciación de machos por su congelabilidad, mediante la puesta a punto del ChemSensor, como herramienta discriminadora según el perfil de fracciones másicas de volátiles y ácidos grasos, en muestras seminales.
- 3) Estudio y mejora de los diluyentes de congelación actuales adecuándolos a la crioconservación de espermatozoides de cerdo Ibérico.
- 4) Incorporación de plasma seminal en los diluyentes de congelación de semen de cerdo Ibérico, para su preservación junto con los espermatozoides en la conservación de recursos zoogenéticos de esta raza.

MATERIAL Y **M**ÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. RESUMEN DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo se centra en el desarrollo de 2 experimentos diferentes que investigan dos de las principales problemáticas que acusan a la conservación de los recursos zoogenéticos de porcino, el estudio de la variabilidad individual en lo que a la calidad del semen a la congelación se refiere, y otra la investigación de la composición de los diluyentes para optimizar el proceso de crioconservación.

La primera experiencia centra su investigación en determinar qué factores pueden ser los causantes de la mejor o peor congelabilidad del semen de cerdo Ibérico, así como tratar de determinar un método clasificatorio de los eyaculados, que permita saber la futura congelabilidad de una muestra sin necesidad de congelarla y contrastarla. Para ello de un total de 37 eyaculados de diferentes cerdos Ibéricos se analizaron distintas variables, que posiblemente estén implicadas (Maldjian *et al.*, 2005; Hernández, 2007) en la congelabilidad de los eyaculados, tales como la composición de los ácidos grasos de la membrana del espermatozoide y del plasma seminal, cuantificación del porcentaje de proteínas del plasma seminal, o la composición de compuestos volátiles en el semen. Todo ello correlacionado con el grado de congelabilidad de esos mismos eyaculados.

El método predictivo estudiado en este caso será el análisis mediante el ChemSensor (seudo-nariz electrónica) del espectro de fracciones másicas obtenidas de muestras de semen completo o ácidos grasos del plasma seminal o del espermatozoide.

La segunda experiencia estudia determinar y mejorar los actuales medios de crioconservación espermática en porcino, adecuándolos a la congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico, para así optimizar la conservación de recursos zogenéticos de esta raza. Para ello se compararon los diluyentes actuales usados en congelación de espermatozoides de cerdos de razas comerciales con los recomendados para la crioconservación de espermatozoides de cerdo Ibérico, y así mismo se investiga el efecto de los detergentes añadidos en uno u otro paso del protocolo de congelación y el estudio de la inclusión de determinados porcentajes de plasma seminal, para tratar de conservar conjuntamente con los espermatozoides la mayor cantidad posible de los diferentes componentes del plasma seminal, necesarios para los distintos procesos llevados a cabo tanto en el espermatozoide como en el tracto genital de la hembra.

4.2. MATERIAL

4.2.1. Animales

Para el estudio de la caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo Ibérico y su congelabilidad se utilizaron 37 eyaculados procedentes de 37 machos de raza Ibérica de diferentes variedades (Retinto, Alentejano, Torbiscal, Lampiño, Entrepelado y Retinto x Entrepelado), de edades comprendidas entre 1 y 4 años, procedentes de diferentes granjas y centros de inseminación. Todos los animales estuvieron alojados en corrales individuales, con acceso al agua ad libitum y con una dieta comercial con los requerimientos nutricionales necesarios para un verraco adulto.

Para el estudio de la optimización de diluyentes se usaron 6 eyaculados procedentes de 6 verracos ibéricos de la variedad Retinta con edades comprendidas

entre 1,5 a 2 años, los cuales fueron recogidos 1 vez por semana, en un total de 6 semanas por experimento. Los machos estuvieron alojados en corrales individuales, con acceso al agua *ad libitum* y con una dieta comercial con los requerimientos nutricionales necesarios para un verraco adulto.

4.2.2. Reactivos y medios

4.2.2.1. Reactivos

- β -Lactosa (L3750-500G, Sigma)
- Ácido cítrico monohidratado (C1909-25G, Sigma)
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA; ED2SS, Sigma)
- Agilent protein 230 kit (5067-1523, Agilent Technologies, USA)
- Bicarbonato sódico (S-5761, Sigma)
- Cisteína (C7352-25G, Sigma)
- Citrato sódico (S-4641, Sigma)
- Cloroformo (C2432-500ML, Sigma)
- Cloruro potásico (P-3911, Sigma)
- Cloruro sódico (S5886-500G, Sigma)
- Dimetil sulfóxido (DMSO, D-8779, Sigma)
- Fructosa (F0127-1KG, Sigma)
- Glicerol (G-5150, Sigma)
- Glucosa (G-6152, Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA)
- Hexano (132063.1612, Panreac)
- Hidróxido Potásico (131515.1210 Panreac)

- Ioduro de propidio (IP; P-4170; Sigma-Aldrich, España)
- Kanamicina (K-4000, Sigma)
- Metanol (141091.1214, Panreac)
- Methyl Pelargonate C-9 (Fluka)
- *Orvus es Paste*: Equex STM (Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA)
- Rhodamina 123 (83702 , Sigma)
- Ropufa 30 n-3 foof old (Marine oil) (04 88631010, Fluka)
- Solución de glutaraldehido (25%) (253857.1611, Panreac)
- Sulfato sodio hidrogenado (14.3854.1210, Panreac)
- SYBR-14 (L-7011; componente A kit live/dead, Invitrogen, Eugene, OR, USA)
- Trizma[®] Base (T1503-100G, Sigma)

4.2.2.2. Medios

Medio de dilución y transporte

Para realizar el transporte de los eyaculados así como para la descongelación, evaluación de la motilidad, la viabilidad y la actividad mitocondrial se utilizó el medio de *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (**Tabla 2**) diseñado por Pursel y Johnson (1975).

Tabla 2. Composición del diluyente *Beltsville Thawing Solution* (BTS).

Componente	mM
Glucosa	205
Citrato sódico	20,4
Bicarbonato sódico	15
EDTA*	3,6
Cloruro potásico	10
Kanamicina	0,07
pH 7,2-7,4	
Osmolaridad (mOsm/L)	295-330

Medios de congelación

En el proceso de congelación se emplearon 2 diluyentes (Diluyente I para incorporarlo en la fase de enfriamiento de 15°C hasta 5°C y diluyente II para el proceso de congelación; **Tabla 3**).

Tabla 3. Composición de los medios de congelación.

Componentes	Diluyente de congelación I					
	Pursel-1	Pursel-2	Westendorf-1	Westendorf-2	Thilmant-1	Thilmant-2
TRIS (mM)	111	111	-	-	-	-
Glucosa (mM)	185	185	-	-	-	-
β -Lactosa (mM)	-	-	310	310	-	-
Fructosa (mM)	-	-	-	-	408,1	408,1
Ácido Cítrico·H ₂ O (mM)	31,4	31,4	-	-	-	-
NaHCO ₃ (mM)	-	-	-	-	1,5	1,5
Cisterna (mM)	-	-	-	-	1,15	1,15
Yema de huevo (%)	20	20	20	20	22,5	22,5
<i>Orvus es Paste</i> (%)	-	1,5	-	1,5	-	1,5
Osmolaridad (mOsm/kg)	293	346	367	391	426	436
Componentes	Diluyente de congelación II					
	Pursel-1	Pursel-2	Westendorf-1	Westendorf-2	Thilmant-1	Thilmant-2
<i>Orvus es Paste</i> (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glicerol (%)	9	9	9	9	6	6
Osmolaridad (mOsm/kg)	1960	2049	2104	2165	1596	1556

Para el estudio de la caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo Ibérico y su congelabilidad se utilizó exclusivamente el diluyente Thilmant-2, basado en la técnica de Thilmant (1997) y recomendado por la FAO (1998), para la conservación de recursos zoogenéticos de porcino.

Para la optimización de los diluyentes de congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico se usaron los seis medios de congelación descritos. Y finalmente para la

valoración del efecto de la inclusión del plasma seminal en los diluyentes de congelación solo se uso el diluyente Westendorf-1.

4.2.3. Preparación de los fluorocromos

Para el estudio de la población espermática se utilizaron diferentes fluorocromos dependiendo del tipo de valoración a realizar:

Viabilidad: Se realizó una doble tinción con los siguientes fluorocromos:

- **SYBR-14**: Compuesto por 10 μL de una solución stock del componente A del kit de viabilidad LIVE/DEAD y diluido en 90 μL de DMSO, para obtener una dilución 1/10. Concentración final 0,1 mM.
- **Ioduro de Propidio (IP)**: Compuesto por la solución stock del componente B del kit de viabilidad LIVE/DEAD, diluida en agua destilada hasta conseguir una concentración 0,5 mg/mL.

Actividad mitocondrial: Se realizó una doble tinción con los siguientes fluorocromos:

- **Rhodamina 123 (Rho 123)**: Compuesto por 30 μL de Rhodamina 123 (5 mg/mL), diluido en 120 μL de DMSO, para obtener una dilución 1/4.
- **Ioduro de Propidio (IP)**: Compuesto por la solución stock del componente B del kit de viabilidad LIVE/DEAD diluida en agua destilada hasta conseguir una concentración 0,5 mg/mL.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Recogida y procesamiento de los eyaculados

El procedimiento de recogida de los eyaculados se basó en el método habitual usado en porcino, por extracción manual sobre un recipiente atemperado a 37°C para evitar choques térmicos que pudiesen perjudicar la calidad seminal y uso de gasa para recoger y desechar el gel o tapioca del eyaculado.

Inmediatamente después de la recogida los eyaculados se diluyeron en BTS atemperado a 37° C en una proporción de 1:1 (vol:vol), posteriormente se realizó un descenso de temperatura hasta los 15°C para tu posterior transporte al laboratorio.

Una vez en el laboratorio se realizó la valoración individual de los eyaculados mediante microscopía de contraste de fases, determinando el porcentaje de motilidad espermática y la calidad del movimiento a 20x, y el estado de acrosoma y el porcentaje de morfoanomalías a 40x, tras su fijación en glutaraldehído (Pursel *et al.*, 1972). La integridad funcional de la membrana se realizó mediante microscopía de fluorescencia usando el kit comercial de viabilidad LIVE/DEAD (Garner y Johnson, 1995).

Para los distintos estudios solo fueron utilizados aquellos eyaculados cuya calidad espermática presentaba como mínimo las siguientes características: $\geq 80\%$ de espermatozoides con morfología normal, $\geq 80\%$ de espermatozoides con el acrosoma intacto, $\geq 75\%$ de espermatozoides móviles y $\geq 75\%$ de espermatozoides viables.

4.3.2. Metodología de crioconservación espermática

El método de congelación utilizado se basó en el procedimiento descrito originalmente para pajuelas de 5 mL por Westendorf *et al.*, (1975) y posteriormente adaptado para pajuelas de 0,5 mL (Thurston *et al.*, 1999 y Carvajal *et al.*, 2004). Todas las muestras de las diferentes experiencias fueron congeladas con este método.

Una vez recogidas las muestras fueron sometidas a un enfriamiento suave durante 3 horas hasta los 15 °C, para su posterior transporte al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, se procedió a la centrifugación de las alícuotas a 2400g, durante 3 minutos a 15 °C (Universal 320R, Hettich zentrifugen, Alemania) (**Figura 4**), para eliminar el plasma seminal y concentrar los espermatozoides. El sobrenadante se eliminó por aspiración usando una bomba de vacío y el pellet resultante se mezcló homogéneamente con el diluyente I (según experimento) de congelación hasta obtener una concentración de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL.

El pellet diluido fue sometido a un descenso de temperatura hasta los 5°C durante 2 horas (0.083°C/min), para lo cual se utilizó un baño termostático programable (Lauda Ecoline, Alemania) (**Figura 5**).



Figura 4. Centrífuga Refrigerada



Figura 5. Baño Termostático Programable

Una vez las muestras se encontraban a 5 °C se volvieron a diluir, en este caso utilizando el diluyente II de congelación (según experimento), hasta una concentración final de 1×10^9 espermatozoides/mL. Inmediatamente después se procedió al envasado en pajuelas de 0,5 mL y al sellado con bolas de acero (Sistema SFS 133 semi-automático de envasado y sellado de pajuelas, Minitüb, Alemania) (**Figura 6**). Las pajuelas se colocaron en racks metálicos y posteriormente en el biocongelador programable.

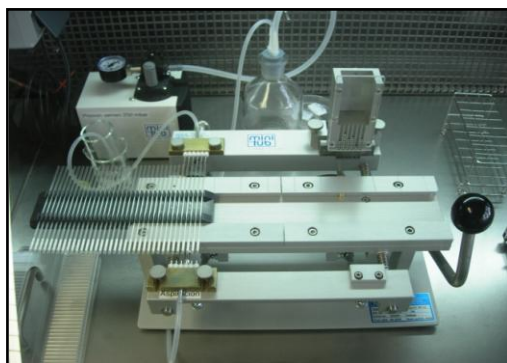


Figura 6. Envasadora y Selladora de Pajuelas

Una vez situados los racks en el biocongelador programable (IceCube 14S, Minitüb, Alemania) (**Figura 7**) se procedió a la congelación, aplicándose una curva de 4 etapas: 1) de 5°C hasta -5°C a una velocidad de -6°C/min; 2) desde -5°C hasta -80°C a una velocidad de -40°C/min; 3) mantener a -80°C durante 30 s y 4) llevar a -140-150°C a una velocidad de -70°C/min (**Figura 8**). Posteriormente se sumergieron y conservaron las pajuelas en nitrógeno líquido hasta su evaluación.



Figura 7. Biocongelador Programable

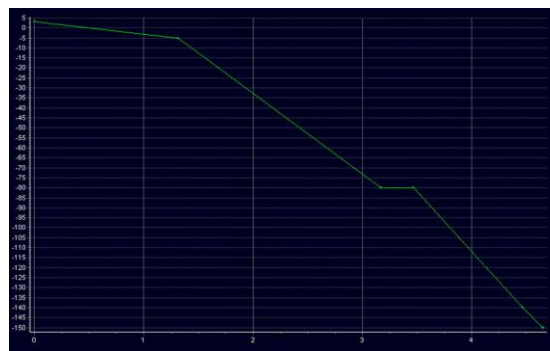


Figura 8. Curva de Congelación

4.3.3. Procedimiento de descongelación

La descongelación de las muestras se realizó en un baño termostático a 37 °C durante 20 segundos (**Figura 9**), obteniéndose una velocidad de descongelación de 1100 °C/min. Todas las muestras de las diferentes experiencias fueron descongeladas con este método.

Tras descongelar las pajuelas se secaron cuidadosamente y se vertió su contenido en un tubo de ensayo con BTS (1:1; vol:vol) atemperado (**Figura 10**), el contenido se incubó a 37 °C hasta un máximo de 30 minutos o 480 minutos según el experimento, como test de resistencia de la vida útil del espermatozoide descongelado.

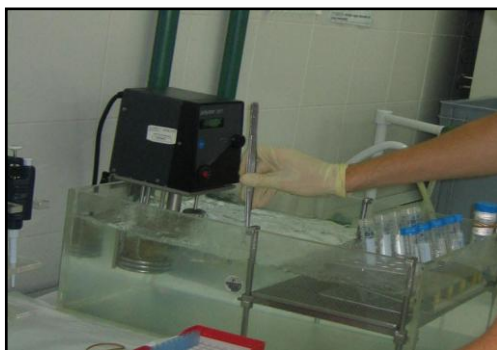


Figura 9. Descongelación



Figura 10. Dilución en BTS

Después de transcurrir los periodos de incubación y previamente a las valoraciones de la calidad espermática se procedió a diluir secuencialmente las muestras descongeladas hasta una concentración final de 25×10^6 espermatozoides/mL, para su visualización en el microscopio.

La muestra analizada de cada uno de los tratamientos resultó de la homogenización del contenido de 3 pajuelas para evitar posibles variaciones de los resultados entre pajuelas.

4.3.4. Valoración de la calidad espermática a la descongelación

Para la determinación de la calidad espermática post-descongelación se valoró 4 parámetros: motilidad y calidad del movimiento, estado del acrosoma, viabilidad (integridad de la membrana plasmática) y actividad mitocondrial. Todas las muestras de las diferentes experiencias fueron valoradas post-descongelación con estos 4 parámetros.

4.3.4.1. Motilidad y calidad del movimiento

La valoración de la motilidad y calidad del movimiento se realizó con el sistema de análisis computerizado SCA (Sperm Class Analyzer® Microptic, Barcelona, España) (**Figura 11**) siguiendo el procedimiento descrito por Cremades *et al.*, 2005.

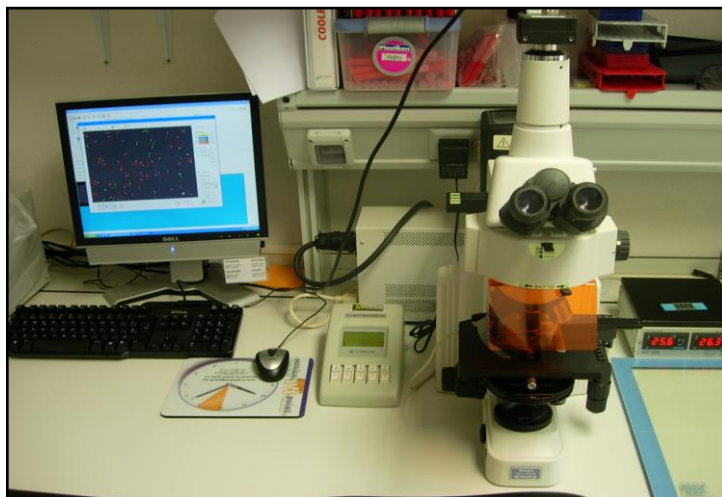


Figura 11. Evaluación de la motilidad, Sistema SCA

Para realizar este análisis se tomaron 2 μL de cada muestra, que se depositaron en una cámara Leja (Leja products B.V. Nieuw-Vennep, Países Bajos) atemperada a

39°C. Se analizaron un mínimo de 3 campos y en cada uno de ellos un mínimo de 100 espermatozoides. Con los datos obtenidos se determinó:

- % Espermatozoides móviles totales.
- % Espermatozoides móviles totales progresivos.
- % Espermatozoides móviles totales progresivos rápidos.

Tan solo se determinaron estos tres parámetros, ya que algunos autores determinan que el resto de parámetros que puede medir este sistema son muy variables, influyendo sobre ellos múltiples factores tanto internos como externos del eyaculado y además de no tener un poder predictivo sobre su futura capacidad fecundante (Quintero, 2003).

4.3.4.2. Valoración de la viabilidad

Para la determinación de la viabilidad se utilizó una doble tinción fluorescente descrita por Garner y Johnson (1995), usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japon) equipado con un filtro de excitación/barrera Nikon G-2A de 510/590, que permite una excitación conjunta del azul y el verde para el SYBR y el IP respectivamente (**Figura 12**). Este método utiliza dos fluorocromos: el SYBR-14 que tiñe de color verde el ácido nucleico de los espermatozoides con la membrana intacta y por lo tanto considerados como vivos (**Figura 13**) y el Ioduro de Propidio (IP) que penetra solamente a través de las membranas dañadas uniéndose a las bases nucleicas y así permitiendo identificar los espermatozoides muertos que se tiñen de color rojo (**Figura 14**). Dos portaobjetos por muestra fueron evaluados, contabilizando un mínimo de 300 espermatozoides por portaobjetos.

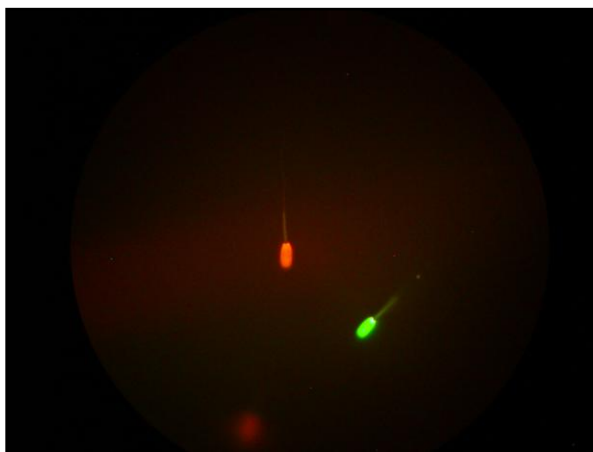


Figura 12. Valoración de la Viabilidad

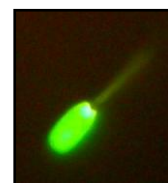


Figura 13. Espermatozoide Vivo



Figura 14. Espermatozoide Muerto

4.3.4.3. Valoración del estado acrosomal

Para esta valoración se determinó el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto, mediante microscopía de contraste de fases a 1000x. Las muestras fueron fijadas en una solución isosmótica al 2% de glutaraldehído, contabilizando un mínimo de 200 espermatozoides por muestra. El daño del acrosoma fue clasificado de acuerdo a lo propuesto por Pursel *et al.*, en 1972. Los espermatozoides que no mostraban un claro y uniforme acrosoma (**Figura 15**) se consideraron como acrosomas dañados (**Figura 16**).

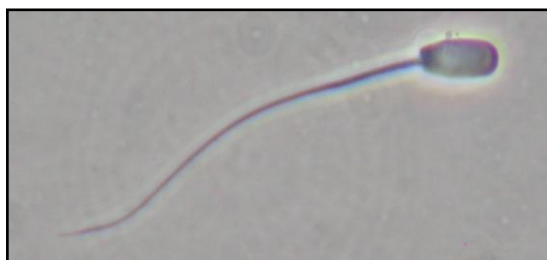


Figura 15. Espermatozoide con el Acrosoma Intacto



Figura 16. Espermatozoide con el Acrosoma Dañado

4.3.4.4. Valoración de la actividad mitocondrial

Para la determinación de la viabilidad y el estado mitocondrial se utilizó una doble tinción fluorescente como la descrita en estudios previos por Fraser *et al.*, 2002. Cada muestra espermática (25×10^6 espermatozoides/mL) fue teñida con 3 μ L de la solución Rho 123 e incubada 15 min a 37 °C en oscuridad. Después las muestras se tiñeron con 20 μ L de IP, incubándolo de nuevo 10 min a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo las diferentes muestras se centrifugaron a 500g durante 5 min, y el sobrenadante fue eliminado. El pellet resultante se resuspendió en 1 mL de BTS.

Para la determinación se usó un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japón) equipado con un filtro de excitación/barrera Nikon G-2A de 510/590, que permite una excitación conjunta del azul y el verde para el Rho 123 y el IP respectivamente. Dos portaobjetos por muestra fueron evaluados, contabilizándose un mínimo de 300 espermatozoides por portaobjetos. Las células espermáticas no teñidas con IP, y teñidas de verde con Rho 123 en la zona media del espermatozoide fueron consideradas como espermatozoides vivos con actividad mitocondrial (**Figura 17**).

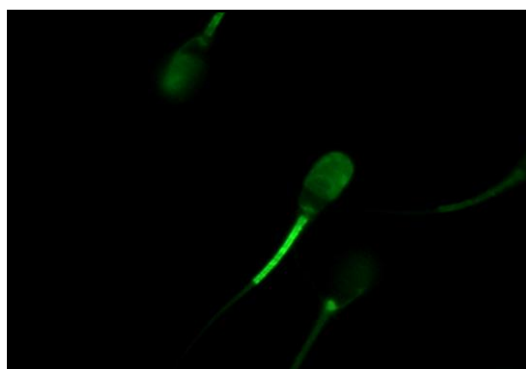


Figura 17. Espermatozoide Vivo con Actividad Mitocondrial

4.3.5. Determinación del perfil de ácidos grasos

Para la determinación de los ácidos grasos se realizó una extracción de lípidos usando el método de Folch *et al.*, de 1956, modificado en el ICTAN para el análisis mediante cromatografía de masas y que consta de 3 fases, extracción, metilación y análisis.

Extracción:

Se realizó la extracción lipídica de muestras de plasma seminal y de pellet de espermatozoides. Las muestras de plasma seminal se filtraron con un filtro de 5 µm de tamaño de poro (Millex®, Millipore, Irlanda), hasta un total de 1 mL. Y de las muestras de pellet de espermatozoides se pesaron 0,3 g.

A las cantidades anteriores de cada una de las muestras se les añadió 6 mL cloroformo-metanol (2:1; vol:vol), agitándolo bien en un vórtex para romper las membranas plasmáticas y homogenizar la muestra. A continuación se añadió 1,2 mL de agua destilada e igualmente se agitó en el vórtex 1 minuto, así en el agua se solubilizarían todas las sustancias no disolubles en disolventes apolares (cloroformo).

Las muestras se centrifugaron a 5000 g y 5 °C (Sorvall Evolution RC, Termo Electrón Corporation, Barcelona) durante 5 min, para separar el extracto clorofórmico en el que estaban los lípidos disueltos. Así se obtienen 3 fases como indica la **figura 18**.

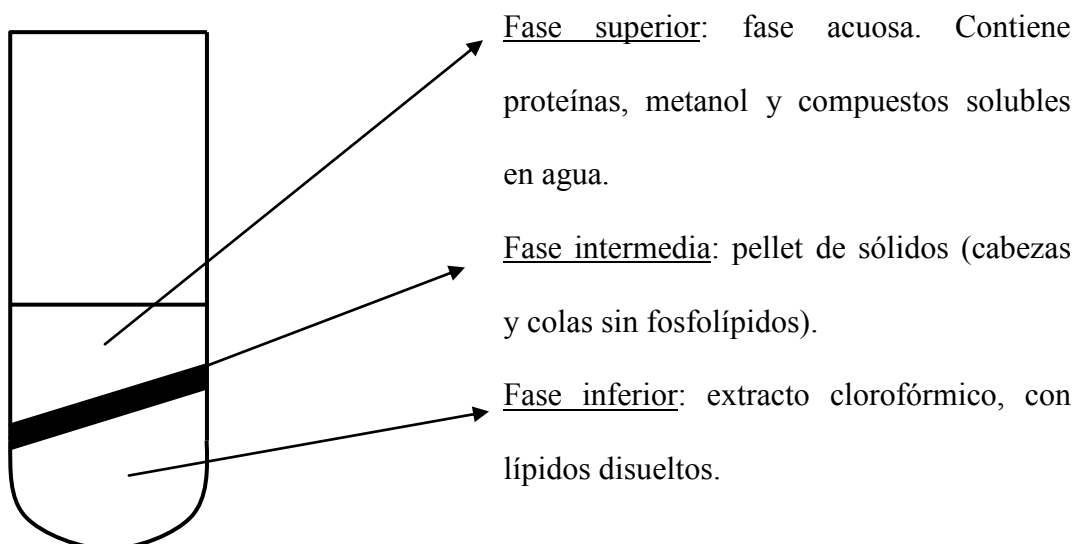


Figura 18. Esquema de Separación de Lípidos por Centrifugación

Usando una pipeta pasteur desechable se recuperó la fase inferior, con cuidado de no arrastrar ninguna de las fases superiores, para a continuación filtrarla con tela Miracloth® y depositarla en el tubo definitivo donde fue metilada posteriormente. El cloroformo se evaporó en un concentrador (Simple concentrador, Technedri-block DB 3A, USA) a 50 °C bajo flujo constante de N₂ (**Figura 19**), congelando la muestra hasta la metilación.



Figura 19. Concentrador de Muestras

Metilación:

La metilación de las muestras es necesaria para el análisis con el cromatógrafo de gases-masas, ya que éste está equipado con una columna de retención de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Para la metilación de las muestras se resuspendieron los lípidos extraídos con 1 mL de hexano + patrón interno [100 mL de hexano + 50 µL de patrón interno C:9 (Methyl Pelargonate)], necesario como control del buen funcionamiento de la metilación. A continuación se añadieron 200 µL de una solución de hidróxido potásico a cada una de las muestras [solución de hidróxido potásico (KOH): 13.202g de KOH enrasado hasta 100 mL con MeOH (Metanol)], el cual será el encargado de metilar los ácidos grasos disueltos en el hexano, es decir añadir un grupo metilo (-CH₃) a la cadena hidrogenada del lípido. Se agitó durante 1 minuto con vórtex y se dejó reaccionar 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadió 0,5 g de sulfato de sodio hidrogenado para detener la reacción de metilación y se centrifugó a 3000 r.p.m. para separar el hexano de la sal añadida, la cual fue recogida poniendo las muestras en los viales del cromatógrafo.

A la vez que las muestras se metiló también un patrón [Ropufa 30 n-3 foof old (Marine oil): 0,1 g de patrón + 3 mL de hexano], el cual se utiliza como un patrón de identificación, ya que de él se conocían los tiempos de retención en el cromatograma de los diferentes ácidos grasos, y por comparación nos permitiría identificar los ácidos grasos extraídos de nuestra muestra.

Análisis:

El análisis de los diferentes ácidos grasos de las muestras se realizó mediante cromatografía de gases-masas. La muestra metilada, se pincha en el equipo, el

cual la vaporiza en el portal de inyección y separa en la columna los distintos ésteres metílicos de los ácidos grasos, lo cuales son analizados en el detector de masas.

Para el análisis de las muestras de ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de masas de Agilet (Mass selective detector 5973 Network Plus+, USA) (**Figura 20**) con una columna de retención de iones DB23 (60 m de longitud, 0,32 mm de diámetro, 0,25 μm de fibra y rango de temperatura de 40 a 250 $^{\circ}\text{C}$; J&W scientific. USA). Obteniendo un cromatograma de masas donde se representan los diferentes picos de las muestras en sus tiempos de retención en la columna, frente a la abundancia de cada uno de ellos (**Figura 21**).



Figura 20. Cromatógrafo de Masas

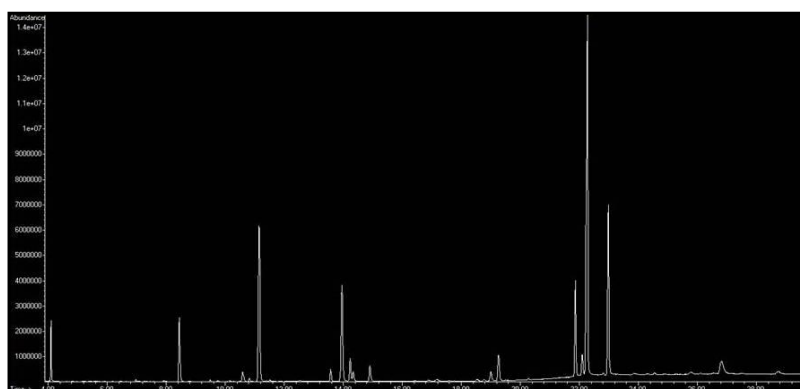


Figura 21. Cromatograma de Ácidos Grasos

Usando el tiempo de retención de la muestra patrón, se identifican cada uno de los compuestos que aparecen en las muestras analizadas.

Los ácidos grasos identificados en las muestras de pellet de espermatozoides y plasma seminal fueron los mostrados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Ácidos Grasos Identificados en el Pellet de Espermatozoide y en Plasma Seminal

Ácido Graso	Nomenclatura química	Abreviación	Tiempo de retención
	Patrón Interno	C:9:0	4,1
Ácido láurico	ácido dodecanoico	C:12:0	6,1
Ácido mirístico	ácido tetradecanoico	C:14:0	8,4
	ácido pentadecanoico	C:15:0	9,7
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	C:16:0	11,1
(n-9) Ácido palmitoleico	ácido 9-hexadecenoico	C:16:1	11,5
Ácido margárico	ácido heptadecanoico	C:17:0	12,5
Ácido esteárico	ácido octadecanoico	C:18:0	13,9
Ácido oleico	ácido 9-octadecenoico	C:18:1	14,2
Ácido linoleico	ácido 9,13-octadecenoico	C:18:2	14,9
Ácido α -linolénico	ácido 9,12,15-octadecenoico	C:18:3w3	15,8
Ácido araquídico	ácido eicosanoico	C:20:0	17,1
Ácido gadoleico	ácido cis-11-eicosanoico	C:20:1	17,6
	ácido cis-11,14-eicosadienoico	C:20:2 (n6)	18,5
	ácido cis-11,14,17-eicosatrienoico	C:20:3 (n3)	19
Ácido araquidónico	ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	C:20:4 (n6)	19,2
	ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	C:20:5	20,2
EPA	ácido cis-7,10,13,16,19-docosopentaenoico	C:22:5	22,8
DPA	ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	C:22:6	23
DHA			

Los resultados obtenidos se mostraron como porcentaje de área de cada uno de estos ácidos grasos respecto al total de áreas. También se determinó el porcentaje de ácidos grasos saturados totales, porcentaje de ácidos grasos insaturados totales, porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y el ratio ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos poliinsaturados.

4.3.6. Análisis del plasma seminal por electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica utilizada en bioquímica para separar diferentes moléculas presentes en una disolución, en nuestro caso proteínas del plasma seminal, en función de la relación carga/tamaño de las mismas. Esta técnica se basa en el flujo electroosmótico (movimiento de un fluido a través de un conducto de muy pequeño diámetro como un capilar o un microcanal que se produce cuando se aplica un campo eléctrico) y permite una separación de las proteínas mucho más rápida que los métodos tradicionales por electroforesis, donde se requieren varias horas para lograr una buena separación de las bandas proteicas. Las muestras se separan en un medio de dispersión suspendido dentro de microcanales, que al ser de un diámetro tan pequeño disipan más fácilmente el calor, permitiendo la aplicación de grandes campos eléctricos sin peligro de que aumente la temperatura y se produzca una distribución no uniforme de las distintas proteínas.

Para el análisis de las proteínas del plasma seminal se utilizó el bionalizador agilent 2100 (Bioanalyzer G2939A, Agilent, USA) (**Figura 22**) y un chip de análisis proteico (Agilent protein 230 kit) (**Figura 23**). Cada chip contiene una matriz de microcanales que separa las proteínas por tamaño, conduciéndolas a través de un medio de electroforesis.



Figura 22. Bioanalizador Agilent 2100

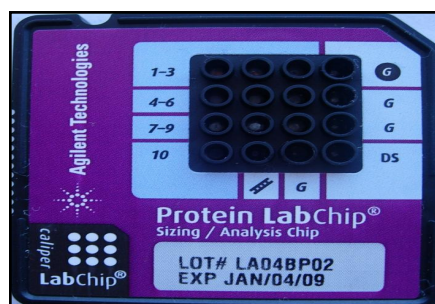


Figura 23. Chip de Análisis Proteico

Las muestras de plasma seminal se filtraron consecutivamente con 2 filtros de diferente tamaño de poro (5 μm y 0,45 μm , Millex®, Millipore, Irlanda) para eliminar los restos celulares. Una vez filtradas las muestras se disolvieron en PBS 1x en una proporción 1:1 (20 μL de muestra + 20 μL PBS 1x) y de esta solución se cargaron 4 μL en el chip Agilent protein 230 kit siguiendo el siguiente protocolo recomendado por la casa comercial.

Paso 1: Preparación de la estación de cargado del chip

Esta estación utiliza una jeringa, la cual por presión será la encargada de que una vez cargado el gel o polímero de electroforesis, éste se reparta por todos los microcanales. La jeringa se carga hasta el volumen adecuado para el tipo de chip (**Figura 24**).



Figura 24. Estación de Cargado

Paso 2: Preparación de los reactivos

Preparación del gel de electroforesis y tinción: se añadieron 25 μL del concentrado de tinción a 650 μL de gel de electroforesis, mezclándolo en un vórtex durante 15 s. A continuación se transfirió a un nuevo vial con filtro y se centrifugó a 2500 g durante 15 min. Posteriormente se procedió a retirar el filtro y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Preparación de la solución de desteñir: se añadieron 650 μL del gel de electroforesis del paso 1 a un nuevo vial con filtro y se centrifugó a 2500 g durante 15 min. Terminada la centrifugación el filtro fue descartado y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Preparación de la solución de desnaturalización: se cargó en el vial de muestra 200 μL del tampón del kit y 7 μL de la solución de β -mercaptoetanol y se mezcló en un vórtex durante 5 s. Se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Preparación de las muestras y del patrón: se tomaron 4 μL de cada una de nuestras muestras diluidas en PBS 1x y se añadieron 2 μL de la solución de desnaturalización, mezclándolo bien y realizando un *spin*. A continuación se pusieron las muestras en un bloque térmico a 95 – 100 °C durante 5 min, dejándolas enfriar después durante unos segundos y realizando de nuevo un *spin*. Seguidamente se añadieron 84 μL de agua desionizada y se mezcló en el vórtex. En el caso del patrón se realizó igual pero sin añadir la solución de desnaturalización.

Paso 3: Cargar el gel de electroforesis con tinción

Se añadieron 12 μL del gel de electroforesis con tinción en el pocillo de carga G (**Figura 25**) y usando la estación de carga se presionó con 1 mL de aire sobre este pocillo durante 60 s, para así difundir por presión el gel por los microcanales. La solución sobrante en el pocillo G se retiró. De nuevo se volvió a cargar 12 μL del gel de electroforesis con tinción en el pocillo de carga G y otros 12 μL en los pocillos g. En el pocillo marcado con DS se añadieron 12 μL de la solución de desnaturalización.

Paso 4: Cargar las muestras y el patrón

Se pipetearon 6 μL de cada una de las muestras previamente preparadas en uno de los 10 pocillos de muestras del chip y se añadieron también 6 μL del patrón en su

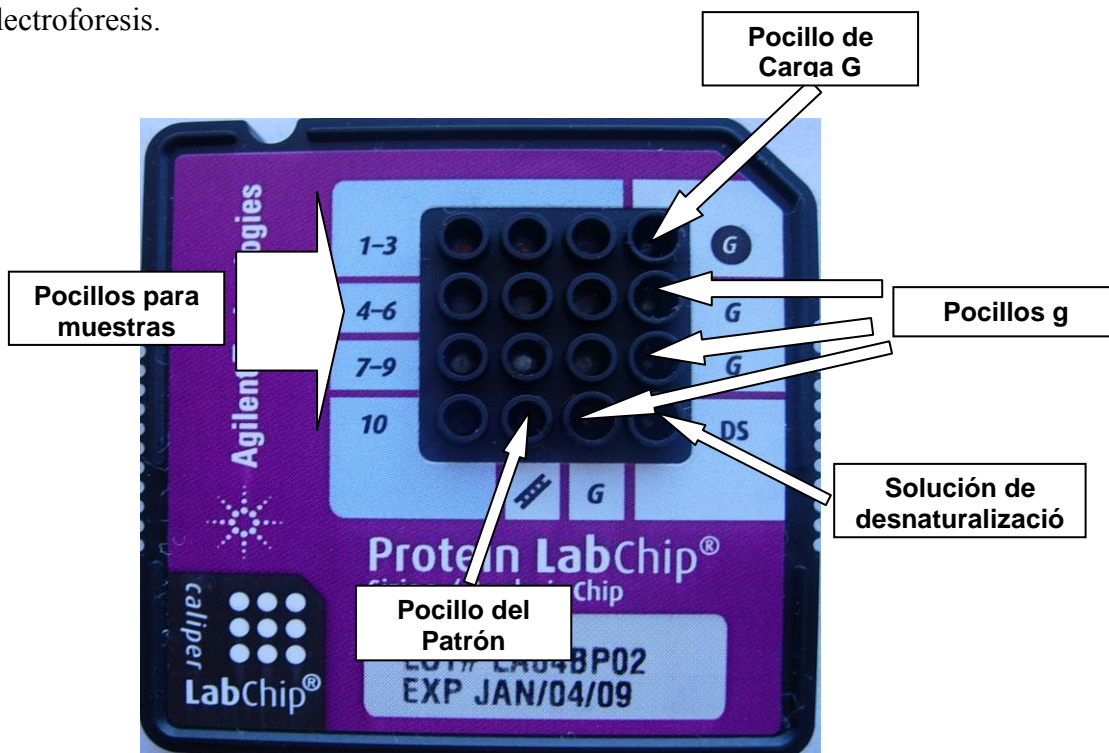


Figura 25. Esquema del Chip de Análisis Proteico

Se obtuvieron electroferogramas (**Figura 26**) donde los diferentes picos, separados por su tamaño, se representaron en función del tiempo de detección (eje X) frente a la cantidad de fluorescencia emitida (eje Y), dándonos el resultado no solo de la presencia de un pico en un tamaño determinado (KDa) sino también el porcentaje de ese pico respecto al total de picos (**Figura 27**) y por tanto la concentración de cada una de las bandas. También se obtuvo una representación digital de la hipotética imagen que tendría el gel si hubiese sido realizado por electroforesis 1D tradicional (**Figura 27**).

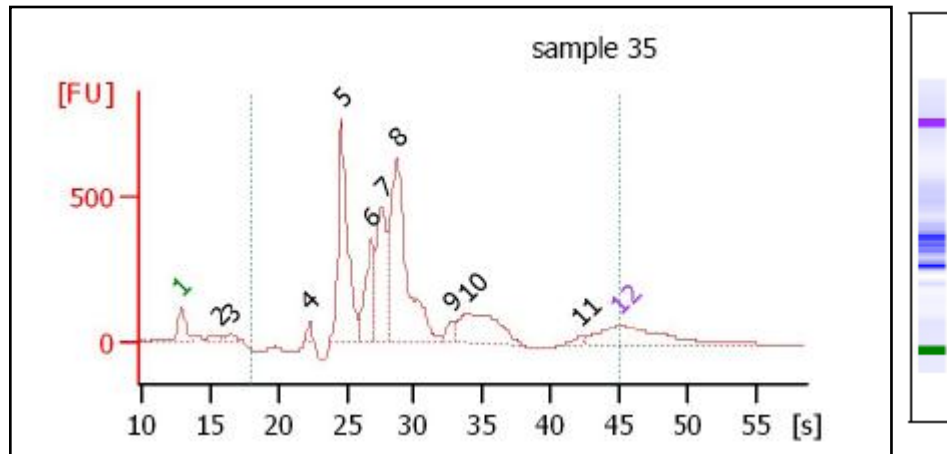


Figura 26. Electroferograma

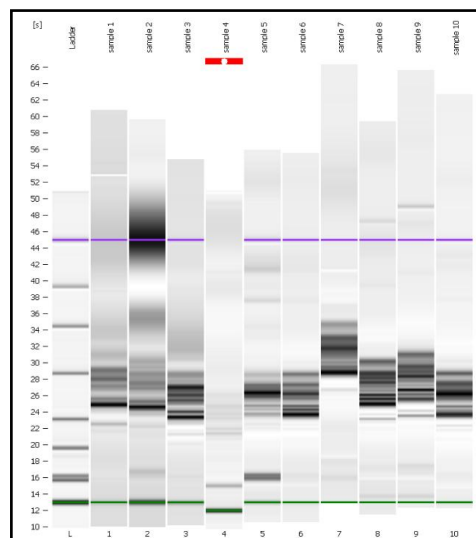


Figura 27. Representación Digital de la Electroforesis

El kit que se usó exhibe un rango entre 1,6 y 96 KDa, y por ello se determinaron aquellas proteínas comprendidas entre estos pesos moleculares, siendo éstos valores los marcadores más bajo y más alto representados por el color verde y violeta en la **Figura 28**, respectivamente.

Para el análisis de los resultados se tomó como variable cada unidad de peso molecular entre el marcador menor (1,6 KDa) y el marcador mayor (96 KDa), determinando en cada muestra seminal de cada macho el porcentaje de cada banda de peso molecular respecto al total de bandas.

4.3.7. Análisis de los volátiles presentes en el semen

Los volátiles son compuestos aromáticos que se desprenden de distintos compuestos orgánicos y que confieren olor a los mismos, y pueden ser analizados mediante cromatografía de gases-masas con la columna adecuada.

El estudio de los compuestos volátiles de las sustancias, es utilizado de forma habitual en la industria de la alimentación para la discriminación de sustancias y determinación de la calidad de las mismas (Luna y Holmer, 2001; Radovic *et al.*, 2001; Ansorena *et al.*, 2001). Y aunque no se ha realizado previamente ningún estudio de los componentes volátiles del semen de porcino, la capacidad de discriminación observada en diferentes tipos de alimentos y sustancias usando este método hacen presuponer, que pudiera servir de herramienta discriminatoria entre eyaculados.

El análisis de los compuestos volátiles del semen se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases-masas y técnicas de espacio de cabeza. Esta técnica se basa en análisis de los compuestos volátiles formados en el espacio de cabeza (parte superior libre del vial en el que se encuentra la muestra), los cuales son transportados posteriormente hacía el sistema de sensores del equipo de cromatografía de gases-masas, para su análisis, que nos generará un cromatograma con los diferentes volátiles detectados.

Para cada análisis se utilizó 1 mL de muestra de semen completo que se homogenizó y colocó en los viales del sistema de espacio de cabeza. Los diferentes componentes volátiles se extrajeron según un método propio del ICTAN y se separaron en el cromatógrafo de gases-masas de Agilet (Mass selective detector 5973 Network Plus+, USA) (**Figura 28**) con una columna de retención de iones HP-5MS. Obteniendo un cromatograma de masas donde cada pico representa un compuesto volátil, y cada

uno de los cuales tendrá un tiempo de retención en la columna y una abundancia diferente (Figura 29).

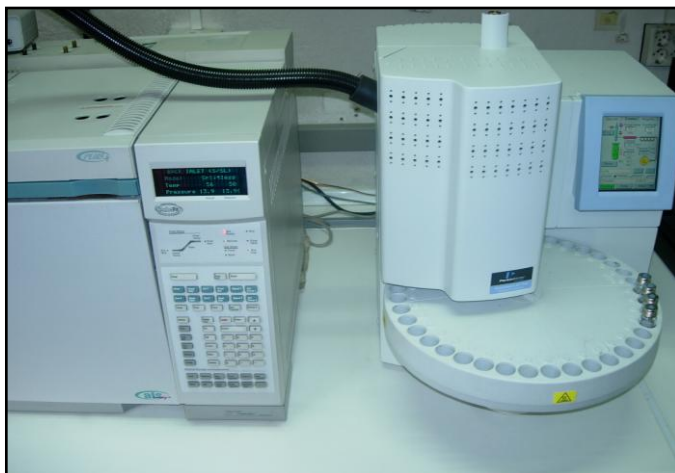


Figura 28. Cromatógrafo de Gases-Masas

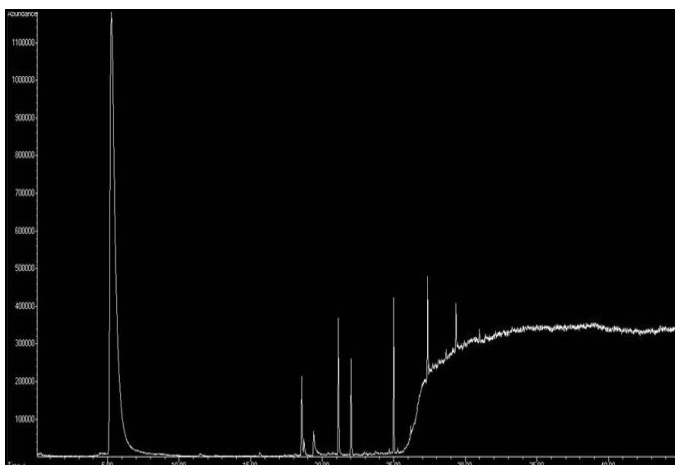


Figura 29. Cromatograma de Compuestos Volátiles

En este caso al no tener un patrón que nos permitiera, por comparación, determinar cuales son los diferentes compuestos volátiles, se usó la librería Wiley incorporada al equipo, la cual permite identificar cada uno de los picos con un porcentaje de probabilidad determinado. Considerando que el compuesto identificado era aquel que poseía el mayor porcentaje de probabilidad, descartándose los que tuvieran una probabilidad inferior al 50%.

Fueron muy pocos los componentes volátiles identificados, siendo la mayoría residuos propios de la columna de retención. Los principales se muestran en la **tabla 5**:

Tabla 5. Compuestos Volátiles Identificados

Compuesto Volátil	Tiempo de retención	% de Probabilidad
Hexane	5,8	86
Hexanol	12,22	72
Benzaldehyde	18,2	52
Cyclotetrasiloxane octamethyl	19,1	74
Nonanal	21,7	95
Cyclopentasiloxane decamethyl	22,61	91
Cyclohexasiloxane dodecamethyl	25,5	91
Silanetriethoxypropyl	25,8	50
Cycloheptasiloxane tetradecamethyl	27,9	72
Benzenacetic acid, alpha 3,4, tris trimethyl	29,9	50

4.3.8. Análisis con el ChemSensor

Este sensor esta formado por un equipo de cromatografía de gases-masas, con la posibilidad de analizar ácidos grasos o compuestos volátiles y el software de transformación y análisis de las fracciones másicas (**Figura 30**).

Debido a la gran cantidad de variables obtenidas al utilizar la cromatografía de masas (hasta 550 variables) es necesario recurrir a programas de quimiometría que permiten la obtención de modelos para poder manipular este gran conjunto de datos y permitir visualizar las agrupaciones de las muestras.



Figura 30. ChemSensor

El sistema de tratamiento de datos usado fue el integrado en el programa informático Piruoette®, utilizando como técnica quimiométrica el método de clasificación SIMCA (*Soft Independent Modelling Class Analogy*), en el cual se clasificó previamente cada una de las muestras (tanto de ácidos grasos de plasma y pellet de espermatozoides, como de volátiles del semen) en función de la congelabilidad que tuvieron esas muestras. Estableciéndose dos grupos para el análisis de las muestras: buenos y malos congeladores.

Este método utiliza todas las fracciones másicas obtenidas en las diferentes muestras para usarlas como variables, para poder crear un modelo que las discrimine en función de una clasificación previa, de esta manera en cada análisis se puede determinar la abundancia de cada una de las fracciones másicas de las muestras analizadas (**Figura 31**), así como las fracciones másicas utilizadas en la clasificación y su peso discriminatorio en las clasificaciones obtenidas (**Figura 32**).

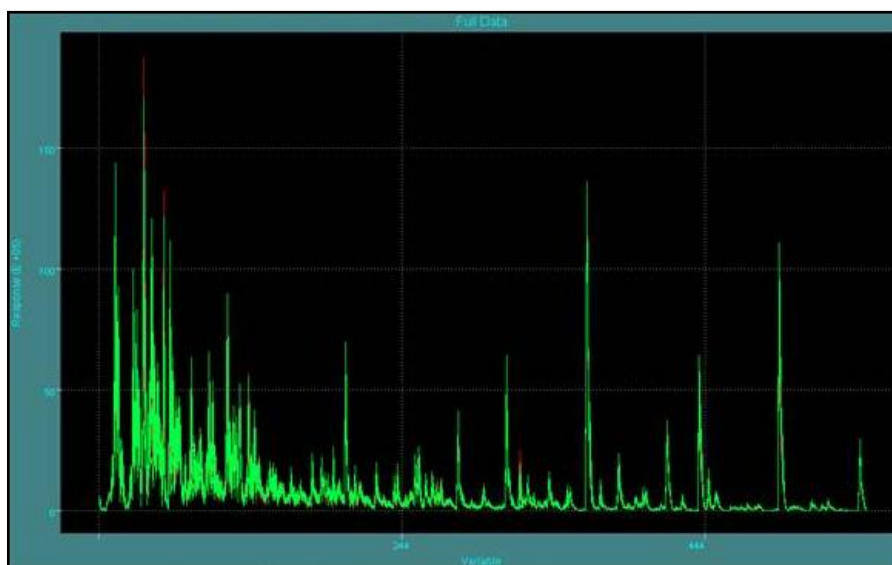


Figura 31. Gráfica de Abundancia de cada Fracción Másica

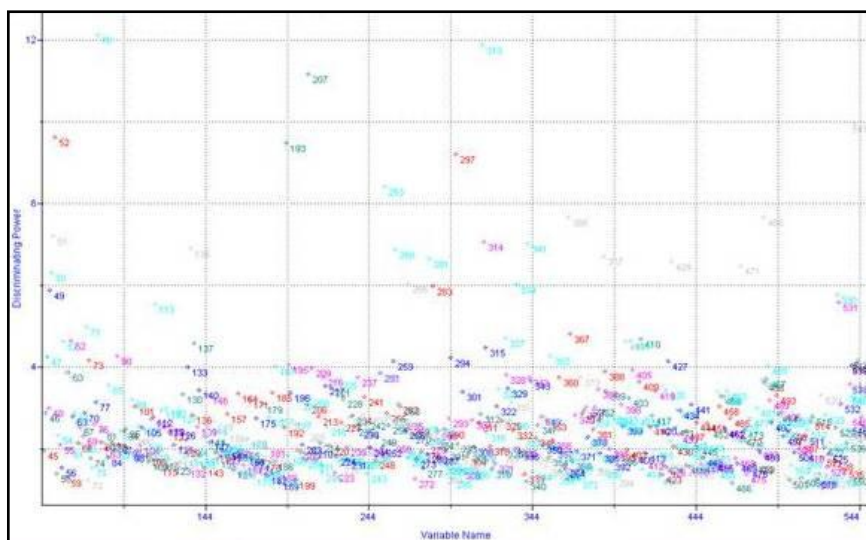


Figura 32. Gráfica del Potencial Discriminante de cada Fracción Másica

Al realizar el análisis SIMCA obtenemos los siguientes resultados:

1) Clasificación de las muestras analizadas. En esta clasificación nos dirá de cada una de las muestras a analizar cuantas pertenecen a un grupo u otro, o si no pertenece a ninguno de ellos.

2) Distancias. Las distancias por las cuales el modelo nos ha discriminado que una muestra pertenezca a un grupo u otro. A mayor distancia mejor capacidad de discriminación del modelo.

Al analizar las posibilidades de clasificación mediante el sistema informático Pirouette, se puede hacer una selección distinta de las fracciones másicas, de la propuesta por el programa en una primera obtención de modelos. De esta manera al disponer de un número reducido de muestras, se puede obtener un modelo más robusto utilizando únicamente las fracciones másicas que más poder de discriminación aportan al modelo.

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.4.1. Experiencia 1: Caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo Ibérico y estudio de su congelabilidad. Uso del ChemSensor como herramienta discriminadora de la congelabilidad entre machos según el perfil de fracciones másicas de volátiles y ácidos grasos.

Esta experiencia se llevó a cabo para la realización de los objetivos número 1 y 2. Para esta experiencia se utilizaron eyaculados completos de 37 verracos de diferentes variedad (Retintos, Entrepelados, Alentejanos, Torbiscuales, Lampiños y RetintoxEntrepelado). Una vez extraídos cada eyaculado se dividió en 3 partes según los análisis posteriores a realizar:

- 1) Semen completo:** se cogió una muestra de 1 mL de semen puro sin diluir, para el análisis de sus compuestos volátiles. Se congeló a -80°C hasta su análisis.
- 2) Plasma seminal y pellet de espermatozoides:** se tomaron 15 mL de semen sin diluir, el cual fue centrifugado inmediatamente después de la extracción a 1000 g, 20 minutos con una centrífuga portátil (EBA-20, Hettich zentrifugen, Alemania), para separar el plasma de los espermatozoides alicuotándolos por separado hasta su transporte al laboratorio. Una vez allí, se realizarón 2 lavados de los espermatozoides en una solución de cloruro sódico (9 g/L), resuspendiendo el pellet y centrifugándolo a 1000 g, 20 minutos a 4 °C (Universal 320R, Hettich zentrifugen, Alemania), para

eliminar todos los restos pertenecientes al plasma seminal. A continuación las muestras se congelaron a -80°C hasta el análisis de los ácidos grasos de la membrana.

El plasma seminal se centrifugó a 3910 g, 30 minutos a 4 °C (Universal 320R, Hettich zentrifugen, Alemania), para eliminar posibles espermatozoides que aún quedasen en suspensión, posteriormente se dividió en 2 nuevas alícuotas, una para la determinación de ácidos grasos y otra para la determinación de proteínas. Las muestras se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

3) Semen para congelar: el resto del eyaculado se diluyó en BTS atemperado a 37 °C, en una proporción de 1:1 (vol:vol) y se transportó hasta el laboratorio a 15 °C para posteriormente realizar la congelación espermática.

Después de congelarse y mantenerse un mínimo de una semana en nitrógeno líquido, los diferentes eyaculados se descongelaron y se valoró su calidad espermática a los 30 minutos de incubación a 37 °C. En función de los parámetros post-descongelación se clasificó cada uno de los eyaculados según su congelabilidad, agrupándolos mediante un análisis de clusters.

Las muestras de volátiles y ácidos grasos se analizaron también con el sensor químico. Junto con la clasificación de la congelabilidad hecha de cada eyaculado, se trató de determinar un modelo de discriminación entre los eyaculados que congelan bien de los que congelan mal.

4.4.2. Experiencia 2: Optimización de los diluyentes de congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico

4.4.2.1. Experimento 1: Valoración de tres diluyentes de crioconservación definidos en la congelación para espermatozoides de cerdo Ibérico. Estudio del efecto de un detergente sintético sobre la calidad espermática

Esta experiencia se llevó a cabo para la realización del objetivo número 3. Para la experiencia 1 se utilizó el diluyente recomendado por la FAO para la congelación de espermatozoides de porcino, pero al valorar su calidad espermática post-descongelación se observó que a los 150 minutos de incubación, parámetros como la viabilidad o la motilidad caían muy por debajo de los valores obtenidos con otros diluyentes usados en otras experiencias propias (de Mercado *et al.*, 2009).

Por ello en esta experiencia se planteó comparar tres tipos de diluyentes basados en tres técnicas diferentes según autores: Westendorf (1975), Pursel (1975) y Thilmant (1997). Westendorf sugirió el uso de la Lactosa como agente crioprotector no penetrante y Pursel recomendó la Glucosa. La FAO por su parte recomienda el diluyente de Thilmant con una base Fructosa que además incorpora *Orvus es Paste* (detergente sintético) en el diluyente I y II. Por ello, también se planteó determinar el efecto de la inclusión del *Orvus es Paste* en los dos diluyentes o solo en el diluyente II (**Tabla 6**).

Tabla 6. Distribución del *Orvus es Paste* en función del Diluyente I o II.

DILUYENTES	INCLUSIÓN DE <i>ORVUS ES PASTE</i>	
	Diluyente I (<i>Orvus es Paste</i>)	Diluyente II (<i>Orvus es Paste</i>)
Pursel-1	NO	SI
Westendorf-1	NO	SI
Thilmant-1	NO	SI
Pursel-2	SI	SI
Westendorf-2	SI	SI
Thimant-2	SI	SI

En esta experiencia se utilizaron 6 eyaculados de 6 verracos ibéricos de la variedad Retinta, recogidos durante seis semanas consecutivas. Cada semana se mezclaron los 6 eyaculados, obteniéndose una muestra heterospérmica para evitar un posible efecto del verraco en la congelación, que se dividió en tantas alícuotas como tratamientos (Ver tabla medios de congelación).

4.4.2.2. Experimento 2: Estudio del efecto de la inclusión del plasma seminal en el diluyente de congelación.

Esta experiencia se llevo a cabo para la realización del objetivo número 4. En el proceso de congelación espermática se descarta el plasma seminal para posteriormente diluir los espermatozoides en el diluyente crioprotector a una concentración determinada. En consecuencia este proceso implica la pérdida de múltiples factores tanto orgánicos como inorgánicos que serán necesarios para el metabolismo del espermatozoide y su transporte por el tracto genital femenino. Por ello en esta experiencia se trató de determinar el efecto de la inclusión del plasma seminal sobre la calidad de los espermatozoides mediante 3 experimentos diferentes.

Para los diferentes experimentos se utilizaron eyaculados de 6 verracos ibéricos de la variedad Retinta, recogidos durante seis semanas consecutivas. Los eyaculados de

cada semana se mezclaron obteniéndose una muestra heterospérmica para evitar un posible efecto del verraco en la congelación, que se dividió en tantas alícuotas como tratamientos.

Para la obtención del plasma seminal necesario para la realización del diluyente y las experiencias de descongelación se recogieron 6 eyaculados completos de estos mismos machos. Cada eyaculado se centrifugó a 3910 g, 30 minutos a 4 °C (Universal 320R, Hettich zentrifugen, Alemania), para eliminar posibles espermatozoides que aún quedasen en suspensión, y se filtró el plasma seminal obtenido con tela Miracloth® (22-25 µm) para retener restos celulares. Las diferentes muestras de plasma seminal obtenidas se mezclaron para obtener una muestra heterogénea, que se usó en todos los diluyentes.

Para el estudio de la inclusión de plasma seminal se plantearon tres experiencias:

4.3.2.2.1. Experimento 2A: Efecto de la sustitución del agua del diluyente de congelación por plasma seminal

Se evaluó el efecto de la sustitución en diferentes proporciones (**Tabla 7**) del agua de dilución por distintos porcentajes de plasma seminal, para tratar de incluir la mayor proporción de plasma seminal sin afectar a la calidad del semen post-descongelación. Para este experimento se usó como base el diluyente Westendorf-1, el cual en la experiencia anterior, mostró ser el diluyente más adecuado para la crioconservación de semen de cerdo Ibérico.

Tabla 7. Composición de los Diluyentes donde se Sustituye el Agua por Plasma Seminal.

Componentes	Diluyente de Congelación I					
	0%Plasma	10%Plasma	25%Plasma	50%Plasma	75%Plasma	100%Plasma
β -Lactosa	310	310	310	310	310	310
Yema de huevo (%)	20	20	20	20	20	20
Plasma seminal (%)	0	10	25	50	75	100
Agua (%)	100	90	75	50	25	0
Osmolaridad, mOsm/kg	319	382	446	511	581	638

Componentes	Diluyente de Congelación II					
	0%Plasma	10%Plasma	25%Plasma	50%Plasma	75%Plasma	100%Plasma
<i>Orvus es Paste</i> (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glicerol (%)	9	9	9	9	9	9
Osmolaridad, mOsm/kg	1433	1545	1600	1747	1813	1859

4.4.2.2.2. Experimento 2B: Efecto de la incubación prolongada de las muestras congeladas con plasma seminal

De los resultados del experimento anterior se observó que aunque no había diferencias significativas respecto al control, el tratamiento con un 25% de plasma seminal parecía tener un comportamiento protector en el tiempo, ya que descendía menos entre 30 y 150 minutos su calidad que el control. Por ello, para esta experiencia se estudió la incubación hasta 480 minutos a 37 °C (simulando el tiempo de vida media del espermatozoide en el tracto genital de la hembra), de los tratamientos de la experiencia anterior con mejores resultados de calidad post-descongelación frente al tratamiento control, que fueron los que incorporaban un 10 y un 25% de plasma seminal. De esta manera se trató de determinar el efecto del plasma seminal sobre la longevidad de los espermatozoides de cerdo Ibérico.

La calidad espermática post-descongelación se determinó a los 30, 150, 240, 360 y 480 minutos, para determinar la evolución de la calidad seminal en el tiempo.

4.3.2.2.3. Experimento 2C: Efecto del plasma seminal en la descongelación e incubación prolongada

En la experiencia anterior se observó un efecto beneficioso en la calidad seminal a lo largo del tiempo al incorporar plasma seminal al diluyente de congelación. Pero para determinar si ese efecto fue debido a la presencia del plasma durante la congelación-descongelación o solo durante la descongelación, en esta experiencia se añadió al diluyente de descongelación un porcentaje de plasma seminal equivalente al del experimento anterior.

En el experimento anterior, en una pajuela de 0,5 mL había un 25% de plasma seminal, al diluirlo en 0,5 mL de BTS en la descongelación el porcentaje final de plasma es por tanto de un 12,5%. Y en el caso del diluyente con 10% sería de un 5%. De esta manera se probarían 3 diluyentes, el de 0%, 5% y 12,5% de plasma seminal en el diluyente de descongelación.

La calidad espermática post-descongelación se determinó al igual que el experimento anterior, a los 30, 150, 240, 360 y 480 minutos, para determinar la evolución de la calidad seminal en el tiempo.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la clasificación de los diferentes eyaculados en función de su congelabilidad se realizó un análisis de clasificación por clusters con el programa estadístico Statgraphics (Versión 15.2.12., StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia, USA). Como variables de discriminación solo se usó el número de espermatozoides vivos totales y el porcentaje de espermatozoides móviles totales a los 30 minutos post-descongelación. Ni las variables de porcentaje de acrosomas intactos, ni el porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial se añadieron al análisis, debido a que su inclusión disminuía considerablemente el coeficiente de correlación del análisis (R^2) con la consecuente pérdida de eficacia. Mediante este análisis se clasificaron los eyaculados en buenos y malos congeladores.

Las diferencias entre las medias de los grupos fueron contrastadas con el paquete estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) mediante un análisis GLM, para determinar que dichas diferencias entre grupos eran significativas ($P < 0,05$). Este análisis se realizó para las muestras de semen, de plasma seminal y de pellet, ya que en algunos casos no se tenía muestras de los tres tipos, por tanto tuvieron diferentes números de eyaculados.

La clasificación realizada con el sensor químico se hizo mediante el programa informático Pirouette (Versión 3.10., Infometrics, INC, USA) usando el sistema de análisis quimiométrico SIMCA (Soft Independent Modelling Class Analogy), como se ha descrito anteriormente.

Para el análisis de las diferencias en proteínas del plasma seminal, ácidos grasos de membrana y del plasma seminal en función de la congelabilidad se utilizó el

procedimiento GLM de SAS, usando para el análisis de las medias el test Least Square Means (LSmeans).

En la prueba con diferentes diluyentes así como en las pruebas del plasma seminal en el medio de congelación, igualmente se determinó las diferencias significativas entre tratamientos mediante el procedimiento GLM de SAS, usando para el análisis de las medias el test Least Square Means (LSmeans). En el caso de la prueba de los diferentes diluyentes, para los parámetros de porcentaje de acrosomas normales, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial, no existió interacción entre los tratamientos y los tiempos de evaluación post-descongelación, por ello en estos datos se combinó los dos tiempos de evaluación (media para 30 y 150 minutos) y fueron analizados como un dato único.

Los resultados en todos los casos se expresan como medias con su respectivo Error Estándar de la Media (EEM). Fueron consideradas las diferencias significativas a $P < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Experiencia 1: Caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo Ibérico y estudio de su congelabilidad. Uso del ChemSensor como herramienta discriminadora de la congelabilidad entre machos según el perfil de fracciones másicas de volátiles y ácidos grasos.

El primer objetivo de esta experiencia fue la valoración bioquímica del eyaculado previamente a la congelación, analizando los ácidos grasos de la membrana espermática y del plasma seminal, las proteínas de este último y el estudio de los volátiles del semen completo; valorando su posible relación con la congelabilidad de los eyaculados. La congelabilidad de estos fue evaluada usando los parámetros de calidad espermática de la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides post-descongelación tras 30 minutos de incubación a 37°C (Roca *et al.*, 2006). Según estos parámetros, los eyaculados fueron posteriormente clasificados en 2 grupos, buenos y malos congeladores. Posteriormente, se relacionaron los grupos de congelabilidad con los resultados obtenidos en la valoración bioquímica previa a la congelación.

El segundo objetivo de este experimento fue determinar el potencial del Chemsensor como herramienta de clasificación de diferentes eyaculados, usando muestras de ácidos grasos (tanto de espermatozoides como de plasma seminal) o muestras de semen completo y comprobando, así, si el sensor químico podría resultar útil como herramienta discriminadora de machos, como buenos o malos congeladores, previamente al proceso de congelación.

5.1.1. Determinación de la congelabilidad y clasificación de los eyaculados.

La clasificación de los eyaculados por congelabilidad se realizó mediante un análisis multivariante por clústers o grupos, usando como criterio de clasificación la media del grupo, donde la distancia entre dos clústers fue la distancia media de las observaciones de un clúster a la del otro. Y la distancia métrica entre clústers usada fue la euclidiana al cuadrado, que es la suma de los cuadrados de las diferencias de los valores de las observaciones en los grupos. Las variables usadas para la clasificación fueron el porcentaje de espermatozoides vivos y el porcentaje de espermatozoides móviles totales (Roca *et al.*, 2006).

Las medias de corte de cada clasificación y el número de animales de cada grupo, según las muestras, fueron las siguientes:

Tabla 8. Medias de corte de la clasificación de la congelabilidad para las muestras de semen completo.

Variab (%)	Grupo de Congelabilidad		
	Buenos	Malos	EEM₁
Vivos	57,8 ^a	42,1 ^b	1,32
Móviles	50,3 ^a	28,5 ^b	1,42
N	20	13	

EEM₁: Error estándar de la media

N: Número de machos incluidos en cada grupo

Letras diferentes en la misma variable indican diferencias significativas (P < 0,05)

Tabla 9. Medias de corte de la clasificación de la congelabilidad para las muestras de pellet de espermatozoides (post-centrifugación).

Grupo de Congelabilidad			
Variables (%)	Buenos	Malos	EEM₁
Vivos	55,9 ^a	41,2 ^b	2,16
Móviles	51,8 ^a	28,9 ^b	2,71
N	21	16	

EEM₁: Error estándar de la media

N: Número de machos incluidos en cada grupo

Letras diferentes en la misma variable indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Tabla 10. Medias de corte de la clasificación de la congelabilidad para las muestras plasma seminal.

Grupo de Congelabilidad			
Variables (%)	Buenos	Malos	EEM₁
Vivos	55,6 ^a	41,5 ^b	1,8
Móviles	51,5 ^a	29 ^b	1,55
N	20	16	

EEM₁: Error estándar de la media

N: Número de machos incluidos en cada grupo

Letras diferentes en la misma variable indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Una vez clasificadas las muestras asignándoles su valor correspondiente de congelabilidad según en que grupo se encuentren sus valores de calidad seminal, se relacionó dicho valor con los resultados obtenidos de extracción lipídica, proteínas y volátiles. Así se trató de relacionar estadísticamente alguno de estos resultados con el mayor o menor potencial de congelación de los machos.

5.1.2. Relación entre volátiles del semen y la congelabilidad.

No se encontró diferencias significativas en el porcentaje de los diferentes volátiles detectados e identificados entre los grupos de congelación ($P>0,05$). El compuesto volátil mayoritario fue el hexano, con un porcentaje de área respecto del total de áreas del 93%. Compuestos como octametil ciclotetrasiloxano, decametil ciclopentasiloxano, decametil ciclohexasiloxano y tetradecametil cicloheptasilosano se identificaron como residuos de la propia columna cromatográfica con un porcentaje medio de 2-3%. El resto de componentes estuvieron presentes en una proporción menor de 0,5%.

5.1.3.- Resultados de la extracción lipídica

5.1.3.1. Extracción de lípidos en pellet de espermatozoides

En el análisis efectuado sobre los 18 ácidos grasos identificados, solo se encontraron diferencias significativas en uno de ellos (ácido dodecanoico (C12:0); $P<0,05$) (**Tabla 11**). No se encontraron diferencias significativas en ningún otro ácido graso así como en los porcentajes de ácidos grasos saturados totales (SAT), ácidos grasos insaturados totales (INSAT), ácidos grasos poliinsaturados (PINSAT), ácidos grasos monoinsaturados (MINSAT), ni en el ratio de ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados (RAT). En la **tabla 11** se observa que aquellos animales considerados malos congeladores tienen un menor porcentaje de ácido dodecanoico (ácido láurico) que los animales que congelan mejor ($P<0,05$).

Tabla 11. Porcentaje de Ácidos Grasos en el Pellet de Espermatozoides.

Ácido Graso	Abreviación	Grupo de Congelabilidad		EEM ₁	P-Valor
		Buenos	Malos		
ácido dodecanoico	C12:0	0,077 ^a	0,103 ^b	0,005	0,029
ácido tetradecanoico	C14:0	12,88	12,07	0,805	0,48
ácido pentadecanoico	C15:0	0,23	0,24	0,016	0,93
ácido hexadecanoico	C16:0	25,46	25,9	0,42	0,47
ácido 9-hexadecenoico	C16:1	0,62	0,65	0,03	0,48
ácido heptadecanoico	C17:0	0,26	0,24	0,012	0,21
ácido octadecanoico	C18:0	15,27	16,5	0,47	0,079
ácido 9-octadecenoico	C18:1	5,94	6,75	0,38	0,15
ácido 9,13-octadecenoico	C18:2 (n6)	3,05	3,26	0,15	0,34
ácido 9,12,15-octadecenoico	C18:3 (n3)	0,05	0,06	0,007	0,26
ácido eicosanoico	C20:0	0,75	0,89	0,06	0,1
ácido cis-11-eicosanoico	C20:1	0,18	0,2	0,008	0,06
ácido cis-11,14-eicosadienoico	C20:2(n6)	0,82	0,7	0,06	0,21
ácido cis-11,14,17-eicosatrienoico	C20:3(n3)	2,67	2,34	0,14	0,12
ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	C20:4 (n6)	3,53	3,51	0,11	0,91
ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	C20:5(EPA)	0,25	0,19	0,025	0,12
ácido cis-7,10,13,16,19-docosopentaenoico	C22:5(DPA)	0,51	0,42	0,07	0,41
ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	C22:6(DHA)	25,57	24,99	1,42	0,77
	SAT	56,3	56,9	1,17	0,72
	INSAT	43,7	43,09	1,17	0,72
	MINSAT	6,52	7,23	0,85	0,33
	PINSAT	37,18	35,86	1,16	0,43
	RAT	0,79	0,77	0,2	0,72

EEM₁: Error estándar de la media.

Letras diferentes en la misma variable indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

SAT (% de ácidos grasos saturados), INSAT (% de ácidos grasos insaturados), MINSAT (% de ácidos grasos monoinsaturados), PINSAT (% de ácidos grasos poliinsaturados) y RAT (Ratio insaturados/saturados)

5.1.3.2. Extracción de lípidos en plasma seminal

No se encontraron diferencias significativas entre grupos de congelabilidad, en los ácidos grasos extraídos del plasma seminal (**Tabla 12**), así como en ninguno de los porcentajes totales (SAT, INSAT, MINSAT, PINSAT, RAT; $P>0,05$).

Tabla 12. Porcentaje de Ácidos Grasos en el Plasma Seminal.

Ácido Graso	Abreviación	Grupo de Congelabilidad		EEM ₁	P-Valor
		Buenos	Malos		
ácido dodecanoico	C12:0	0,32	0,27	0,05	0,52
ácido tetradecanoico	C14:0	1,72	1,78	0,17	0,8
ácido pentadecanoico	C15:0	0,19	0,15	0,025	0,34
ácido hexadecanoico	C16:0	30,7	31,7	1,98	0,73
ácido 9-hexadecenoico	C16:1	1,61	1,73	0,16	0,59
ácido heptadecanoico	C17:0	0,56	0,57	0,05	0,94
ácido octadecanoico	C18:0	23,9	24,4	3,16	0,91
ácido 9-octadecenoico	C18:1	31,7	30	4,92	0,81
ácido 9,13-octadecenoico	C18:2 (n6)	3,56	4,22	0,63	0,47
ácido 9,12,15-ostadecenoico	C18:3 (n3)	0,32	0,29	0,042	0,59
ácido eicosanoico	C20:0	0,53	0,51	0,06	0,83
ácido cis-11-eicosanoico	C20:1	0,58	0,75	0,13	0,39
ácido cis-11,14-eicosadienoico	C20:2(n6)	0,32	0,39	0,06	0,37
ácido cis-11,14,17-eicosatrienocio	C20:3(n3)	0,27	0,27	0,046	0,97
ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	C20:4 (n6)	0,47	0,44	0,08	0,79
ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	C20:5(EPA)	0,28	0,24	0,05	0,54
ácido cis-7,10,13,16,19-docosopentaenoico	C22:5(DPA)	0,36	0,28	0,07	0,38
ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	C22:6(DHA)	1,8	1	0,37	0,14
	SAT	58,5	60,29	5,38	0,82
	INSAT	41,42	39,71	5,38	0,82
	MINSAT	34,1	32,6	5,14	0,84
	PINSAT	7,32	7,1	0,5	0,76
	RAT	0,95	0,99	0,19	0,87

EEM₁: Error estándar de la media.

Letras diferentes en la misma variable indican diferencias significativas ($P<0,05$).

SAT (% de ácidos grasos saturados), INSAT (% de ácidos grasos insaturados), MINSAT (% de ácidos grasos monoinsaturados), PINSAT (% de ácidos grasos poliinsaturados) y RAT (Ratio insaturados/saturados)

En el cromatograma de los ácidos grasos extraídos del plasma seminal y de la membrana espermática (pellet del espermatozoide) se observaron picos que no pudieron ser identificados, ni con el patrón ni con la librería propia del programa de análisis; por ello, no se tuvieron en cuenta en el análisis.

5.1.4. Análisis del plasma seminal por electroforesis capilar

En el análisis proteico del plasma seminal se consideraron como variables: el tamaño de la banda proteica para cada uno de los pesos moleculares comprendidos entre los marcadores de 5 a 96 kDa obteniendo así un total de 91 variables. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha banda respecto al total y analizados estadísticamente mediante un GLM.

Para la clasificación por congelabilidad, según buenos y malos congeladores, solo se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en 2 de las bandas proteicas (15 kDa y 25 kDa); en el resto, no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$; **Tabla 13**).

Tabla 13. Porcentaje de Bandas Proteicas.

Tamaño de banda proteica	Grupo de Congelabilidad		
	Buenos	Malos	EEM ₁
15-kDa	15,15 ^a	4,38 ^b	2,4
25-kDa	0,24 ^a	5,66 ^b	1,7

EEM₁: Error estándar de la media.

Letras diferentes en la misma variable indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

5.1.5. Evaluación del ChemSensor como herramienta de discriminación entre grupos de clasificación del potencial de congelabilidad.

A partir de las muestras de ácidos grasos del pellet de espermatozoides, de ácidos grasos del plasma seminal y de volátiles del semen completo, se analizó el perfil iónico por medio del sensor químico (ChemSensor) y se buscó una posible correspondencia con la clasificación previa de los machos por congelabilidad.

Los resultados obtenidos en función del tipo de muestra (ácidos grasos de pellet de espermatozoide o de plasma seminal, o volátiles del semen completo), en función de los grupos de clasificación por congelabilidad (buenos y malos congeladores) se muestran a continuación:

5.1.5.1. Análisis de las fracciones másicas

El bajo número de animales analizados, frente al elevado número de fracciones másicas que pueden ser usadas como variables de discriminación, hacen poco robustos los modelos que se pudieran obtener. Así para reforzar el modelo de discriminación se realizó una selección de fracciones másicas, eliminando del modelo aquellas con menor capacidad discriminante.

En el caso de los volátiles fueron seleccionadas 66 fracciones másicas de un total de 500, para los ácidos grasos de membrana se seleccionaron 85 y para los ácidos grasos del plasma seminal 87 fracciones másicas de 500.

- Clasificación previa:

En la **tabla 14** se puede observar como en función de la clasificación previa realizada, el modelo nos da una clasificación predicha o esperada de las diferentes muestras analizadas.

Tabla 14. Clasificación con Exclusión de Fracciones Máficas en Función de su Congelabilidad, para Muestras de Volátiles del Semen Completo, Ácidos Grasos de la Membrana del Espermatozoide y del Plasma Seminal.

		Malos predichos	Buenos predichos	No clasificados
Volátiles	Malos	12	1	0
	Buenos	0	20	0
AG Membrana	Malos	16	0	0
	Buenos	1	20	0
AG Plasma	Malos	16	0	0
	Buenos	0	20	0

AG Membrana: Ácidos grasos de membrana espermática.

AG Plasma: Ácidos grasos del plasma seminal.

El número de animales difiere entre las muestras analizadas, pero en los tres casos, los animales clasificados como buenos congeladores son perfectamente discriminados de los malos congeladores. En cambio, en el grupo de los malos congeladores existen animales clasificados como buenos, creando así falsos positivos. En las muestras de volátiles, solo un animal fue clasificado erróneamente por el modelo como buen congelador, y para las muestras de ácidos grasos de plasma seminal, clasificando perfectamente cada uno de los machos analizados. En el caso de los ácidos grasos de membrana aparece un falso negativo, es decir un buen congelador clasificado como malo.

- Distancias:

Las distancias entre grupos nos indican como de diferentes son dos muestras en función del grado de separación entre ellas. Por debajo de las distancias obtenidas, se considera un residuo y el modelo es incapaz de determinar si pertenecen a un grupo u a otro (**Tabla 15**).

Tabla 15. Distancias con Exclusión de Fracciones Másicas en Función de su Congelabilidad, para Muestras de Volátiles del Semen Completo, Ácidos Grasos de la Membrana del Espermatozoide y del Plasma Seminal.

		Malos	Buenos
Volátiles	Malos	0	2,62
	Buenos	2,62	0
AG Membrana	Malos	0	0,73
	Buenos	0,73	0
AG Plasma	Malos	0	1,37
	Buenos	1,37	0

AG Membrana: Ácidos grasos de membrana espermática.

AG Plasma: Ácidos grasos del plasma seminal.

Al observar las distancias se observa como éstas son bajas, ya que para que se consideren diferentes significativamente entre ellas, la distancia debería ser de al menos 3. A pesar de ello, los modelos clasifican muy bien, con un número muy bajo de falsos positivos y negativos. La mayor distancia entre grupos fue para el modelo obtenido de las muestras de volátiles del semen completo, que con un valor de 2,62 está muy próximo a 3 y por tanto a ser diferente significativamente. La menor distancia fue para el modelo de las muestras de ácidos grasos de la membrana espermática donde las distancias ni siquiera pudieron superar la unidad.

Cuando se realiza la exclusión de aquellas fracciones másicas que poseen menor capacidad de discriminación el modelo mejora, aumentando el número de animales bien clasificados y acrecentando la distancia de discriminación. Solo el modelo obtenido con el plasma seminal, discriminó perfectamente entre buenos y malos congeladores. En los otros dos, aún queda un animal sin clasificar correctamente. A pesar de ello, el modelo de discriminación realizado con los volátiles del semen es más fiable, debido a que las distancias de separación son mayores, que para el modelo de discriminación según los ácidos grasos del pellet y de plasma seminal (2,62 frente a 0,73 y 1,37 respectivamente).

5.2. Experiencia 2: Optimización de los diluyentes de congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico.

5.2.1. Experimento 1: Valoración de tres diluyentes de crioconservación definidos en la congelación para espermatozoides de cerdo Ibérico. Estudio del efecto de un detergente sintético sobre la calidad espermática.

El objetivo de esta experiencia fue doble, por un lado se valoraron tres tipos de diluyentes basados en tres técnicas diferentes según autores: Lactosa de Westendorf (1975), Glucosa de Pursel (1975) y Fructosa de Thilmant (1997), para determinar cuál de ellos resulta más adecuado para la congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico y por otro lado, determinar el efecto de la inclusión de un detergente sintético (*Orvus es Paste*) en el medio de congelación ya sea en el periodo de enfriamiento (en el diluyente I; ver material y métodos) y/o solo en la congelación (en el diluyente II; ver material y métodos).

Para ello, se realizó el estudio de diferentes parámetros de calidad seminal como son la viabilidad, motilidad, estado del acrosoma y actividad mitocondrial a los 30 y 150 minutos de incubación post-descongelación de los espermatozoides, como test de resistencia.

No existieron interacciones entre los diluyentes y el tiempo de evaluación post-descongelación (30 y 150 minutos) en el porcentaje de acrosomas intactos, en la integridad de la membrana plasmática y en la actividad mitocondrial. Por ello, en estas variables, los resultados para los 30 y 150 min se combinaron realizando la media de los

mismos, para realizar un único análisis. No fue el caso de los parámetros de motilidad y calidad del movimiento, donde los resultados para 30 y 150 minutos fueron analizados por separado (**Tabla 16**).

Tabla 16. Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta y Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta.

Variables	Diluyentes de Congelación						EEM ₁
	Pursel-1	Westendorf-1	Thilmant-1	Pursel-2	Westendorf-2	Thilmant-2	
% EAN	48,67	50,33	48,5	46,17	46,17	47,33	2,511
% EMPI	53,07 ^{ab}	56,42 ^a	50,38 ^b	39,26 ^c	44,97 ^d	39,99 ^{cd}	1,894
% EVAMI	53,08 ^a	56,28 ^a	53,25 ^a	37,44 ^b	41,26 ^b	36,14 ^b	1,84

EEM₁: Error estándar de la media.

Letras diferentes entre tratamientos, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

EAN: espermatozoides con acrosoma normal; EMPI: espermatozoides con membrana plasmática intacta; EVAMI: espermatozoides vivos con actividad mitocondrial intacta

El estado del acrosoma después de la descongelación no mostró diferencias significativas entre ninguno de los diluyentes estudiados ($P > 0,05$). El porcentaje de espermatozoides vivos con la membrana intacta fue mayor en los medios que incorporaron el *Orvus es Paste* solo en el diluyente II que aquellos que lo incorporaron en el diluyente I y II ($P < 0,001$), siendo el diluyente Westendorf-1 y el diluyente Pursel-1, los que mayores porcentajes mostraron. Asimismo, en lo que se refiere a la actividad mitocondrial los medios que incorporaban *Orvus es Paste* solo en el diluyente II poseían mejores valores que los que lo incorporaban en el medio I y II ($P < 0,001$).

Los resultados demostraron la existencia de dos grupos bien diferenciados, el primero con los mejores valores post-descongelación en el que se incluyen los diluyentes que solo incorporan el *Orvus es Paste* en el diluyente II, y el segundo que incluye el *Orvus es Paste* en el diluyente I y II.

Tabla 17. Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos a los 30 y 150 Minutos Post-descongelación.

Variables a los 30 y 150 minutos	Diluyentes de Congelación						
	Pursel-1	Westendorf-1	Thilmant-1	Pursel-2	Westendorf-2	Thilmant-2	EEM ₁
% EMT-30	54,82 ^{ab}	65,55 ^a	56,68 ^{ab†}	51,45 ^{abc†}	47,7 ^{bc†}	39,2 ^{c†}	5,1
% EMT-150	43,73 ^a	59,83 ^b	37,33 ^{ac}	5,10 ^d	26,32 ^c	11,83 ^d	4,52
% EMP-30	32 ^a	52,23 ^b	43,75 ^{bc†}	28,18 ^{a†}	36,6 ^{ac†}	28,12 ^{a†}	3,71
% EMP-150	28,37 ^{ac}	50,1 ^b	27,45 ^{ce}	2,03 ^d	17,13 ^{ef}	6,67 ^{df}	3,69
% EMPR-30	34,05 ^{ac}	49,38 ^b	42,33 ^{ab†}	25,43 ^{c†}	29,98 ^{c†}	24,82 ^{c†}	3,39
% EMPR-150	25,7 ^a	46,22 ^b	23,23 ^a	1,28 ^c	12,92 ^d	5,45 ^{cd}	3,53

EEM₁: Error estándar de la media.

† Diferencias significativas entre el tiempo 30 y 150 min.

Letras diferentes entre tratamientos, implica diferencias significativas < 0,05.

EMP: espermatozoides móviles progresivos; EMT: espermatozoides móviles totales; EMPR: espermatozoides móviles progresivos rápidos.

El porcentaje de espermatozoides móviles totales (EMT) a los 30 min fue bajo para los diluyentes Westendorf-2 y Thilmant-2 ($P < 0,05$), mientras que a los 150 minutos todos los diluyentes mostraron valores bajos, a excepción del diluyente Westendorf-1 que de nuevo poseía el mayor porcentaje de EMT ($P < 0,05$) (Tabla 17). Con los datos obtenidos se demuestra que la incorporación del *Orvus es Paste* en el diluyente I y II es perjudicial para los EMT a los 150 min de incubación.

El porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (EMP) muestra una evolución similar a los EMT en todos los tratamientos, siendo el diluyente Westendorf-1 el que presenta mejores resultados a los 150 min de incubación ($P < 0,05$). De igual forma, en el caso de los espermatozoides móviles con movimiento rápido y progresivo (EMPR), el mayor valor a los 150 minutos de incubación fue para el diluyente de Westendorf-1 ($P < 0,05$) seguido por los diluyentes de Thilmant-1 y Pursel-1.

En todas las variables observadas, los diluyentes con *Orvus es Paste* solo en el diluyente II son mejores que los que lo incorporan en los dos medios. Además el medio Westendorf-1 destaca como el diluyente con mayor efecto protector en la congelación, teniendo en cuenta los dos tiempos de descongelación y evaluación estudiados.

5.2.2.- Experimento 2: Estudio del efecto de la inclusión del plasma seminal en el diluyente de congelación

Una vez determinado el diluyente Westendorf-1 como el más adecuado para la congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico, se planteó el estudio de la inclusión del plasma seminal en dicho medio. Para ello, se realizaron tres experiencias dirigidas al estudio del efecto beneficioso o perjudicial del plasma seminal durante y después de la congelación.

5.2.2.1. Experimento 2A: Efecto de la sustitución del agua del diluyente de congelación por plasma seminal.

El objetivo de esta experiencia fue determinar que porcentaje de plasma seminal era el más adecuado para sustituir el solvente de dilución (agua destilada) del diluyente de congelación, manteniendo o mejorando los valores de calidad post-descongelación de los espermatozoides de cerdo Ibérico.

Los tratamientos, según el porcentaje de plasma seminal incluido, fueron seis: 0% (control: agua en el diluyente, sin plasma seminal); 10%, 25%, 50%, 75% y 100% de plasma seminal. Al aumentar la incorporación de plasma seminal, la osmolaridad de los medios se incrementó considerablemente (**Tabla 7**). Para valorar cada uno de los diluyentes, se determinó la calidad seminal mediante el estudio de los parámetros de viabilidad, motilidad, estado del acrosoma y actividad mitocondrial pre-congelación y a los 30 y 150 minutos de incubación post-descongelación de los espermatozoides.

La valoración pre-congelación se determinó en dos momentos diferentes del proceso de enfriamiento previo a la congelación, cuando las muestras se encontraban a

10°C (1 hora de descenso de temperatura hasta 5°C) y a los 5°C (2 horas de descenso de temperatura) justo después de añadirles el diluyente II con el Glicerol y el *Orvus es Paste*.

Tabla 18. Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta, Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta, Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos Pre-congelación.

Variable	T (°C)	Diluyentes de congelación						EEM ₁
		0%Plasma	10%Plasma	25%Plasma	50%Plasma	75%Plasma	100%Plasma	
% EAN	10	96	96,8	97,2	96	95,2	94	1,91
% EAN	5	94,4	95,6	92,4	93,2	94	90,8	1,87
% EMPI	10	80,3 ^a	82,3 ^a	81,7 ^a	80,6 ^{a†}	76,3 ^{a†}	65 ^b	3
% EMPI	5	78,1 ^a	80,2 ^a	79,4 ^a	75,2 ^{ab}	70,3 ^b	59,6 ^c	2,98
% EVAMI	10	79,9 ^a	82,3 ^a	78,3 ^a	81,5 ^a	76,2 ^a	63,7 ^b	2,41
% EVAMI	5	83,2 ^a	82,6 ^{ab}	82,5 ^{ab}	77,3 ^b	69,3 ^c	62,6 ^d	2,55
% EMT	10	95,2 ^a	95,4 ^a	95,1 ^{a†}	95,1 ^a	88,8 ^{a†}	77,1 ^b	2,88
% EMT	5	93,7 ^a	92,3 ^a	90,6 ^a	81,5 ^a	78,4 ^a	52,9 ^b	8,24
% EMP	10	38,8 ^{ab†}	33,5 ^{b†}	36,9 ^{ab†}	44,8 ^a	40,3 ^{ab†}	37,5 ^{ab}	5,42
% EMP	5	64,6 ^a	57,8 ^a	56,4 ^a	55,1 ^a	57,3 ^a	37,5 ^b	5,5
% EMPR	10	38,2 [†]	32,6 [†]	35,4 [†]	42,9	37,7 [†]	33,8	5,31
% EMPR	5	63,4 ^a	57 ^{ab}	56,1 ^{ab}	52,5 ^b	54,5 ^{ab}	32,5 ^c	4,92

EEM₁: Error estándar de la media.

† Diferencias significativas entre temperatura 10°C y 5°C.

Letras diferentes entre tratamientos, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

T: Temperatura; EAN: espermatozoides con acrosoma normal; EMPI: espermatozoides con membrana plasmática intacta; EVAMI: espermatozoides vivos con actividad mitocondrial intacta; EMT: espermatozoides móviles totales; EMP: espermatozoides móviles progresivos; EMPR: espermatozoides móviles progresivos rápidos.

En el periodo pre-congelación el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (EAN) no se vió influenciado ni por el tratamiento ni por el tiempo de incubación pre-congelación ($P>0,05$) (**Tabla 18**).

En lo que a la viabilidad se refiere, a 10 °C solo el tratamiento con 100% de plasma seminal fue diferente del resto ($P<0,05$), mientras que a 5 °C los tratamientos con mayor cantidad de plasma seminal comenzaron a disminuir su porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática intacta (EMPI), observándose un descenso significativo ($P<0,05$) en los tratamientos de 50% y 75% de plasma seminal a 5 °C con respecto a los espermatozoides evaluados a 10 °C.

En el caso del porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial (EVAMI) el comportamiento fue prácticamente igual que en el caso de los EMPI, pero no hubo diferencias significativas entre los momentos de evaluación ($P>0,05$).

En el porcentaje de espermatozoides móviles totales (EMT) solo hubo diferencias significativas en el diluyente de congelación con 100% de plasma seminal, con un menor porcentaje respecto al resto de diluyentes tanto a 10 °C como a 5 °C.

En el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (EMP) a 10 °C todos los tratamientos se comportaron de forma similar, con algunas diferencias entre el tratamiento de 10 y el 50% de plasma seminal. Pero a los 5 °C solo hubo diferencias significativas ($P<0,05$) entre el tratamiento del 100% del diluyente con plasma seminal y el resto.

Por último, en la variable espermatozoides móviles con movimiento progresivo y rápido (EMPR) a 10 °C no se observó ninguna diferencia significativa entre tratamientos, pero a 5 °C se observó que según se disminuía la cantidad de plasma seminal en el diluyente de congelación aumentaba el porcentaje de espermatozoides móviles con un movimiento progresivo y rápido.

Tabla 19. Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta, Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta, Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos a los 30 y 150 minutos Post-descongelación.

Variable	Tiempo (min)	Diluyentes de congelación						EEM ₁
		0%Plasma	10%Plasma	25%Plasma	50%Plasma	75%Plasma	100%Plasma	
% EAN	30	61,3 ^{a†}	62,3 ^{a†}	61,3 ^{a†}	48 ^{b†}	41,7 ^{bc}	36,3 ^c	5,48
% EAN	150	52,5 ^a	40,7 ^{bc}	43 ^b	35 ^{bcd}	34 ^d	31,3 ^d	3,99
% EMPI	30	60,5 ^{a†}	58,6 ^{a†}	56,1 ^{ab}	49,9 ^{bc†}	43 ^c	45,9 ^c	3,74
% EMPI	150	54,2 ^a	52 ^a	55,8 ^a	44,3 ^b	42,9 ^b	43,5 ^b	3,17
% EVAMI	30	59,9 ^{a†}	56,4 ^{ab}	54,6 ^{ab}	51,3 ^{bc†}	46 ^{bc†}	44,5 ^c	3,98
% EVAMI	150	52,5 ^{ab}	53,4 ^a	55,2 ^a	45,6 ^{bc}	40,5 ^c	40,6 ^c	3,52
% EMT	30	67 ^{a†}	59,7 ^a	62,5 ^a	47,2 ^b	27,3 ^c	22,2 ^c	4,9
% EMT	150	55,5 ^a	52,7 ^{ab}	55,7 ^a	43,9 ^b	25,8 ^c	16,5 ^c	5,34
% EMP	30	54,9 ^{a†}	49,8 ^a	49,1 ^a	32,3 ^b	16,6 ^c	11 ^{c†}	3,58
% EMP	150	42,5 ^a	41,8 ^a	45,7 ^a	30,4 ^b	15,9 ^c	7,7 ^c	4,53
% EMPR	30	49,9 ^{a†}	47,4 ^{a†}	45,1 ^a	26,9 ^b	12,7 ^c	8,1 ^{c†}	3,67
% EMPR	150	36,7 ^a	36,6 ^a	41,6 ^a	24,4 ^b	11,8 ^c	4,6 ^c	4,56

EEM₁: Error estándar de la media.

† Diferencias significativas entre el tiempo 30 y 150 min.

Letras diferentes entre tratamientos, implica diferencias significativas (P<0,05).

EAN: espermatozoides con acrosoma normal; EMPI: espermatozoides con membrana plasmática intacta; EVAMI: espermatozoides vivos con actividad mitocondrial intacta; EMT: espermatozoides móviles totales; EMP: espermatozoides móviles progresivos; EMPR: espermatozoides móviles progresivos rápidos.

En la valoración post-descongelación, se observaron diferencias significativas en el estado del acrosoma post-descongelación (P<0,05) (**Tabla 19**). A los 30 minutos de incubación no existieron diferencias entre los 3 primeros tratamientos, pero si entre éstos con el resto (P<0,05), siendo como en el caso de la pre-congelación el tratamiento del 100% del diluyente con plasma seminal, el que resultó en peores porcentajes.

Mientras que a los 150 minutos, el grupo control es el que tuvo mejores resultados con diferencia ($P<0,05$), observándose una disminución del porcentaje de EAN al ir aumentando la cantidad de plasma seminal.

En el caso de los EMPI los tres primeros tratamientos (0%, 10% y 25% de plasma seminal) presentaron los mejores valores frente al resto ($P<0,05$) y fueron disminuyendo con el aumento del plasma seminal en el diluyente, tanto a los 30 como a los 150 minutos. De forma similar se comporta la variable EVAMI donde tanto a los 30 como a los 150 minutos los tratamientos de 0, 10 y 25% de plasma seminal tuvieron los mejores resultados.

En el caso de la motilidad para las tres variables medidas EMT, EMP, EMPR el comportamiento de los tratamientos fue igual tanto a los 30 como a los 150 minutos de incubación. Pudiéndose identificar tres grupos según sus resultados, el primero englobaría a los tratamientos de 0, 10 y 25% de plasma seminal en el diluyente que fueron los que significativamente ($P<0,05$) tuvieron mayores valores para estas variables con respecto a los otros dos grupos. El segundo fue el grupo intermedio, conformado exclusivamente por el tratamiento que incluye un 50% de plasma seminal en el diluyente, siendo respecto a los otros grupos significativamente diferente ($P<0,05$). Y el grupo 3 fue el que presentó los porcentajes más bajos respecto a los otros grupos ($P<0,05$) y estuvo integrado por los tratamientos de 75% y 100% de plasma seminal en el diluyente.

De forma general, los diluyentes que incluyen el 75% y el 100% de plasma seminal en su composición son los que peores características tanto pre-congelación como post-descongelación presentaron. El diluyente con un 50% de plasma seminal es el que más valores intermedios presentó para las variables estudiadas, siendo un punto de inflexión con respecto a los peores y los mejores tratamientos. Los diluyentes con un

25% y un 10% de plasma seminal no fueron significativamente diferentes del control ($P>0,05$) salvo para el porcentaje de EAN. Pero se observó como en el control disminuían significativamente todas las variables estudiadas entre tiempos de incubación (30 y 150 minutos). En cambio, en el diluyente con un 25% de plasma seminal las variables se mantuvieron sin diferencias entre tiempos de incubación, lo que cabe pensar que la inclusión del plasma seminal en el diluyente de congelación pudiera ejercer un efecto protector a lo largo del tiempo tras la descongelación de los espermatozoides.

5.2.2.2. Experimento 2B: Efecto de la incubación prolongada de las muestras congeladas con plasma seminal.

El objetivo de esta experiencia fue determinar si el plasma seminal incorporado al medio de congelación podría ejercer un efecto protector a lo largo del tiempo sobre los valores de calidad post-descongelación de los espermatozoides de cerdo Ibérico, alargando de esta manera la vida del espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra si fuera inseminado.

En este caso se seleccionaron los dos mejores tratamientos obtenidos en el experimento anterior (10% y 25% de plasma seminal en el diluyente) y se compararon entre sí y con el control. Para valorar cada uno de los tratamientos, se determinó la calidad seminal mediante el estudio de los parámetros de viabilidad, motilidad, estado del acrosoma y actividad mitocondrial a los 30, 150, 240, 380 y 480 minutos de incubación post-descongelación de los espermatozoides, simulando la vida media que tiene el espermatozoide descongelado en el tracto genital de la hembra (8 horas; Waberski *et al.*, 1994).

Tabla 20. Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta, Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta, Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos a los 30, 150, 240, 360 y 480 minutos Post-descongelación.

Variable	Tiempo (min)	Diluyente de congelación			EEM ₁
		0%Plasma	10%Plasma	25%Plasma	
% EAN	30	67,7	66,4	67	2,7
% EMPI		62,2	63,5	60,8	3,45
% EVAMI		60,6	60,9	60,4	2,58
% EMT		63,3	61,2	58,8	2,69
% EMP		56,9 ^a	53,9 ^{ab}	50 ^b	1,99
% EMPR		54,1	51,2	47,4	3,68
% EAN	150	57,3	61,6	53,7	3,98
% EMPI		58,3	57,2	59,6	2,42
% EVAMI		57,7	56,8	57,2	3,09
% EMT		46,2	45,4	48,3	3,15
% EMP		37,8	39	43	3,89
% EMPR		32,3	34,6	38,2	3,5
% EAN	240	51,7	46,4	47	4,14
% EMPI		53,2	53,9	56,6	2,58
% EVAMI		53,9	54,8	54,2	1,93
% EMT		37,9	39,2	46,7	5,18
% EMP		31	34	40,5	5,37
% EMPR		25,1 ^a	28,6 ^a	37,8 ^b	3,7
% EAN	360	42,3	42	41,7	3,36
% EMPI		47,8	51,1	51,1	3,6
% EVAMI		47,1	49,6	50,4	2,15
% EMT		32,6 ^a	32,3 ^a	40,4 ^b	3,19
% EMP		25 ^a	24,6 ^a	34,3 ^b	3,97
% EMPR		19,7 ^a	19,6 ^a	29,9 ^b	3,6
% EAN	480	32	34,8	34,7	2,33
% EMPI		42,3 ^a	48,5 ^{ab}	50,6 ^b	3,26
% EVAMI		41,8 ^a	47,1 ^{ab}	49,2 ^b	3,38
% EMT		20,9 ^a	22,7 ^a	29,1 ^b	1,74
% EMP		17 ^a	16,8 ^a	22,9 ^b	1,69
% EMPR		12,7	13,9	18,2	3,71

EEM₁: Error estándar de la media.

Letras diferentes entre tratamientos, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

EAN: espermatozoides con acrosoma normal; EMPI: espermatozoides con membrana plasmática intacta; EVAMI: espermatozoides vivos con actividad mitocondrial intacta; EMT: espermatozoides

móviles totales; EMP: espermatozoides móviles progresivos; EMPR: espermatozoides móviles progresivos rápidos.

En la **tabla 20** se puede observar como, a los 30 minutos de incubación, no existieron diferencias significativas en ninguna variable ($P>0,05$) entre ninguno de los tres tratamientos; a excepción del porcentaje de EMP donde el control tenía una mayor porcentaje respecto a los otros dos ($P<0,05$).

A los 150 minutos no existen diferencias entre ninguno de los tratamientos ($P>0,05$) y a los 240 minutos solo en la variable porcentaje de EMPR, donde el tratamiento con 25% de plasma seminal tuvo valores mayores que los otros tratamientos.

A partir de los 360 minutos de incubación comenzaron a surgir la mayoría de las diferencias significativas; observándose que en las tres variables de motilidad, el tratamiento con el 25% de plasma seminal en el diluyente presentaba los mayores porcentajes; siendo diferente significativamente de los otros dos diluyentes ($P<0,05$).

A los 480 minutos, las diferencias en las variables de motilidad son iguales que a 360 minutos; a excepción del porcentaje de EMPR, donde no hubo diferencias entre tratamientos ($P>0,05$). A estas variables se sumaron las variables de porcentaje de EMPI y porcentaje de EVAMI, donde el tratamiento de 25% de plasma seminal en el diluyente presentó porcentajes superiores al control, mientras que el tratamiento de 10% de plasma seminal en el diluyente no tuvo diferencias con ninguno de los otros dos.

Dentro de cada tratamiento existieron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de incubación, y los resultados se expresan en las siguientes gráficas:

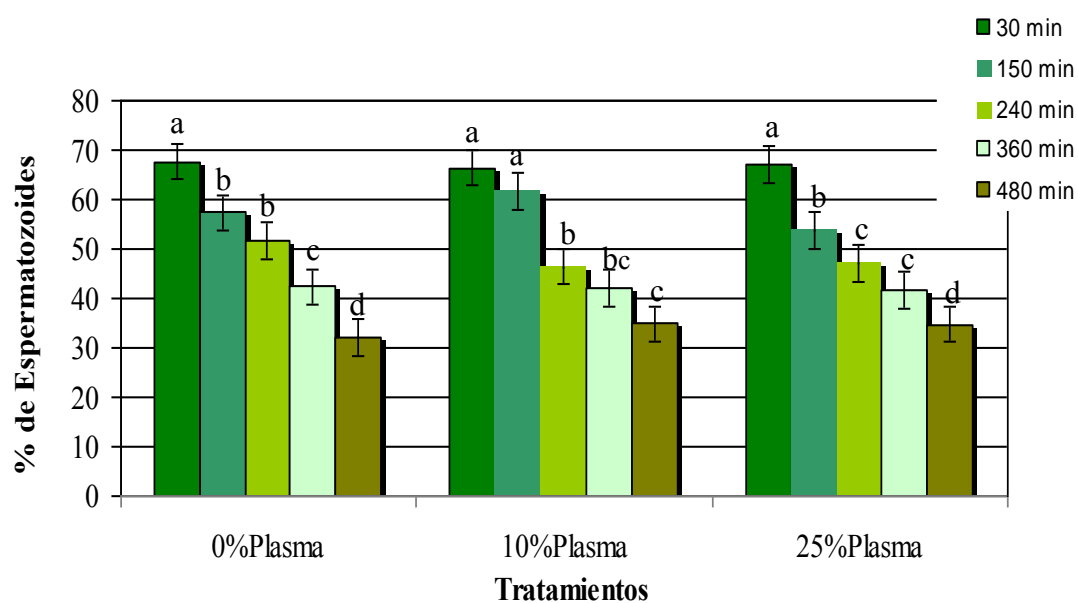


Figura 33. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides con Acrosomas Intactos
 Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

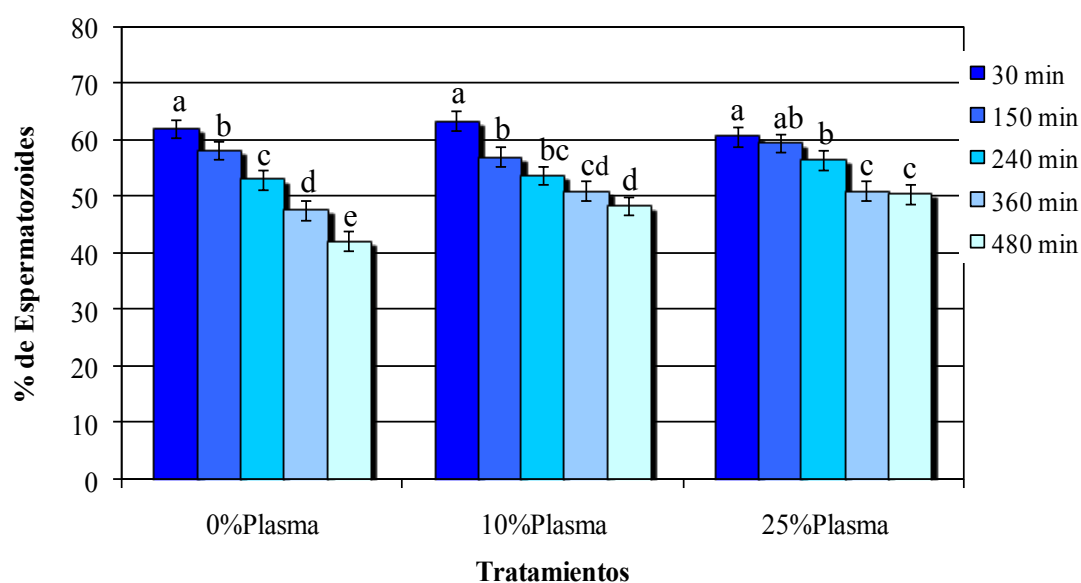


Figura 34. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Con Membrana Plasmática Intacta
 Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

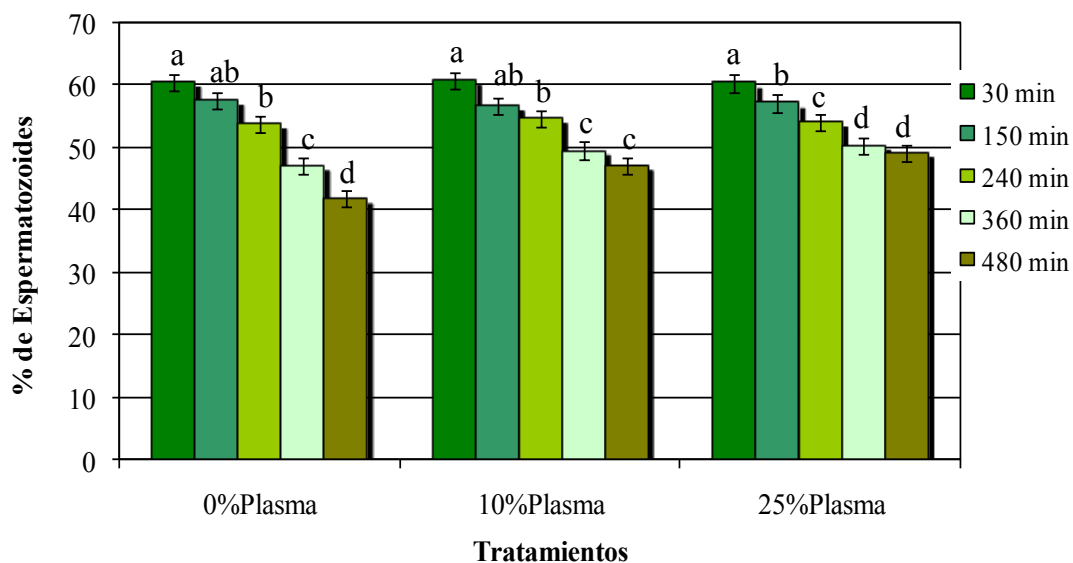


Figura 35. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Vivos Con Actividad Mitocondrial
Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

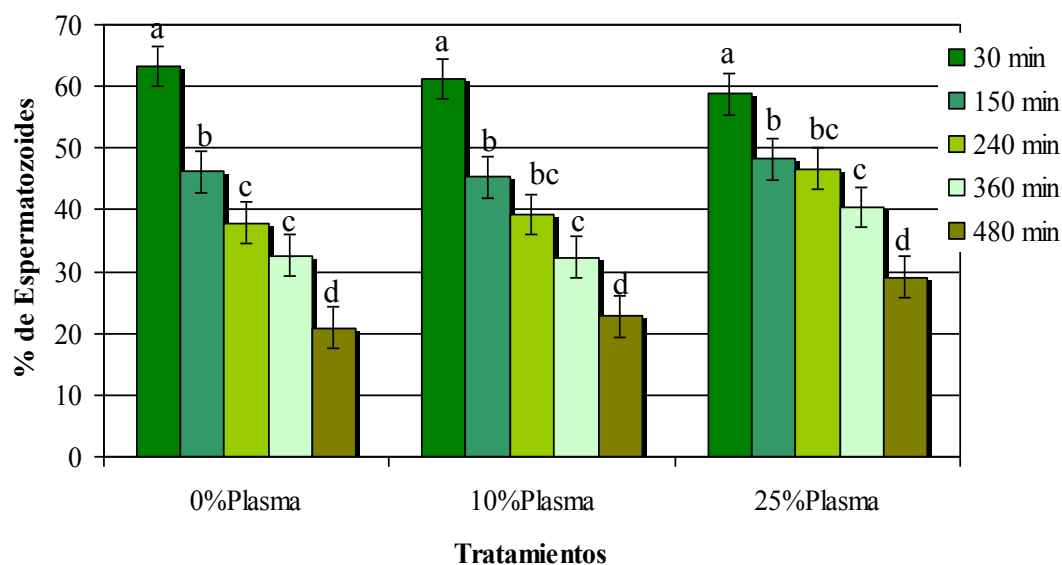


Figura 36. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales
Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas

En las **Figuras 35 y 36** se puede observar como los espermatozoides congelados con un 25% de plasma seminal en el diluyente de congelación, presentan un menor descenso a lo largo del tiempo, teniendo a los 480 minutos mejores resultados que el control.

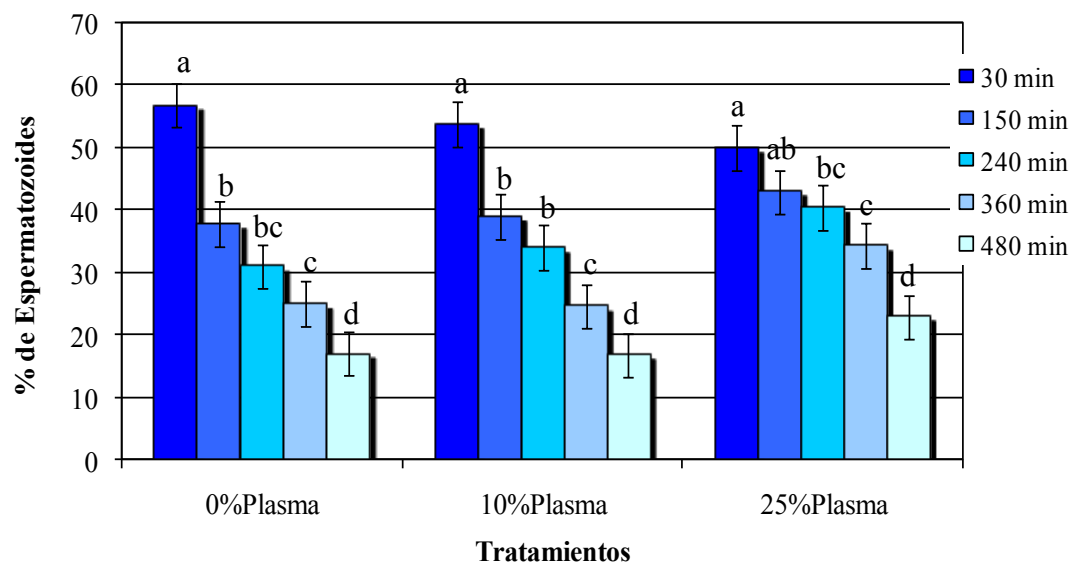


Figura 37. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Progresivos
Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas

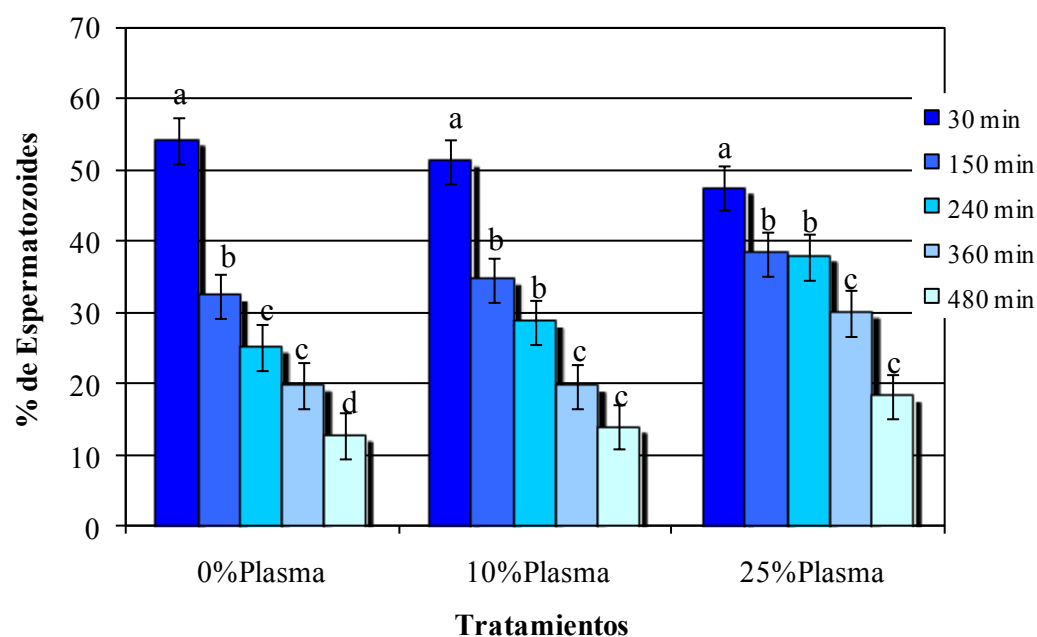


Figura 38. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Progresivos Rápidos
Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

En el caso de la motilidad, en las tres variables estudiadas (porcentaje de EMT, EMP y EMPR) se observó como en el control y el tratamiento con el 10% de plasma seminal en el diluyente descendía mucho más sus valores desde los 30 minutos a los 150 minutos respecto al tratamiento con el 25% de plasma seminal.

Al observar las gráficas, se determinó que el tratamiento con el 25% de plasma seminal mantenía mejor los valores de calidad espermática a lo largo del tiempo respecto al medio control, que no incorpora plasma seminal en su composición, sobre todo en cuanto a parámetros de motilidad se refiere. Por tanto, puede haber un posible efecto protector del plasma seminal sobre los parámetros de calidad espermática post-descongelación. Para ello, se planteó la siguiente experiencia con el fin de determinar si dicho efecto protector del plasma seminal era ejercido durante el proceso de enfriamiento-congelación o exclusivamente durante la incubación post-descongelación de los espermatozoides.

5.2.2.3. Experimento 2C: Efecto del plasma seminal en la descongelación e incubación prolongada.

El objetivo fue determinar si el efecto protector ejercido por el plasma seminal era debido a su presencia en el medio de congelación y, por tanto, durante el proceso de enfriamiento-congelación-descongelación, o si su protección era consecuencia de su presencia durante la incubación a 37 °C post-descongelación.

Para esta experiencia se substituyó parte del BTS de descongelación por plasma seminal en proporciones de 0,5 y 12,5%, que simulaban la proporción final de plasma seminal incubado a 37 °C post-descongelación de la experiencia anterior. Asimismo, se determinó la calidad espermática post-descongelación (viabilidad, motilidad, estado del acrosoma y actividad mitocondrial) a los 30, 150, 240, 360 y 480 minutos.

Tabla 21. Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta, Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta, Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos a los 30, 150, 240, 360 y 480 minutos Post-descongelación.

Variable	Tiempo (min)	Diluyentes de descongelación			
		0%Plasma	5%Plasma	12,5%Plasma	EEM ₁
% EAN	30	67,6	68,3	66	3,69
% EMPI		64,9	64,7	65,4	1,53
% EVAMI		65,6	67,2	66	1,81
% EMT		62,2	66,6	61,6	2,47
% EMP		52,5 ^{ab}	55,3 ^a	50,8 ^b	1,48
% EMPR		50,8 ^{ab}	53,8 ^a	48,6 ^b	1,77
% EAN	150	50,3	51,3	52	3,72
% EMPI		59,5	58,2	59,3	1,16
% EVAMI		57,6	60,9	59,5	2,13
% EMT		51,8	54,7	55,2	2,87
% EMP		46,7	49,2	48,4	3,7
% EMPR		43,4	45,3	44	3,78
% EAN	240	40,7 ^a	45 ^a	51 ^b	3,79
% EMPI		55 ^a	57,9 ^b	58,5 ^b	1,22
% EVAMI		52,8 ^a	57,9 ^b	57,2 ^b	1,93
% EMT		49,2	52,1	48,4	2,67
% EMP		44,5	46,8	42,9	2,89
% EMPR		39,5	42,2	38,8	2,89
% EAN	360	35,7 ^a	44 ^b	34,3 ^a	3,5
% EMPI		51,65 ^a	54,4 ^b	55,9 ^b	1
% EVAMI		49,6 ^a	54,1 ^b	54,5 ^b	1,7
% EMT		38	42,9	42,4	2,52
% EMP		31,3 ^a	38 ^b	34,7 ^c	1,46
% EMPR		26,9 ^a	32,9 ^b	29,8 ^{ab}	1,4
% EAN	480	30	34,3	32,7	3,6
% EMPI		49,4	51,2	51,2	1,76
% EVAMI		46,1 ^a	49,3 ^b	49 ^b	0,76
% EMT		30,5	36,5	31	3,04
% EMP		25,7	30,7	26,5	2,79
% EMPR		20,8	26,3	23,1	2,8

EEM₁: Error estándar de la media.

Letras diferentes entre tratamientos, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

EAN: espermatozoides con acrosoma normal; EMPI: espermatozoides con membrana plasmática intacta; EVAMI: espermatozoides vivos con actividad mitocondrial intacta; EMT: espermatozoides móviles totales; EMP: espermatozoides móviles progresivos; EMPR: espermatozoides móviles progresivos rápidos.

En esta experiencia, contrariamente a la anterior, no se observó una clara evolución de los resultados (**Tabla 21**).

En el % de EAN no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) en los tiempos 30, 150 y 480 minutos, mientras que a los 240 minutos el tratamiento con 12,5% de plasma fue significativamente mejor que el resto en los parámetros de calidad de la membrana ($P<0,05$); sin embargo, a los 360 minutos, el diluyente de descongelación con un 5% de plasma seminal fue el que presentó mejores resultados.

En lo que se refiere a la viabilidad de los espermatozoides, tanto el porcentaje de EMPI como el porcentaje de EVAMI tuvieron un comportamiento similar, observándose que los diluyentes con plasma seminal a partir de los 240 minutos mantienen mejor la viabilidad que el grupo control, siendo solo diferentes significativamente ($P<0,05$) a los 480 minutos para el porcentaje de EVAMI.

En cuanto a la motilidad, en ninguno de los tiempos evaluados se encontró diferencias significativas ($P>0,05$) en el porcentaje de espermatozoides móviles totales, aunque si se observó una mejoría en el porcentaje de EMP y EMPR en el diluyente de des-congelación con un 5% de plasma seminal a los 30 y los 360 minutos de incubación ($P<0,05$).

Dentro de cada tratamiento existieron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de incubación y los resultados se muestran en las siguientes gráficas:

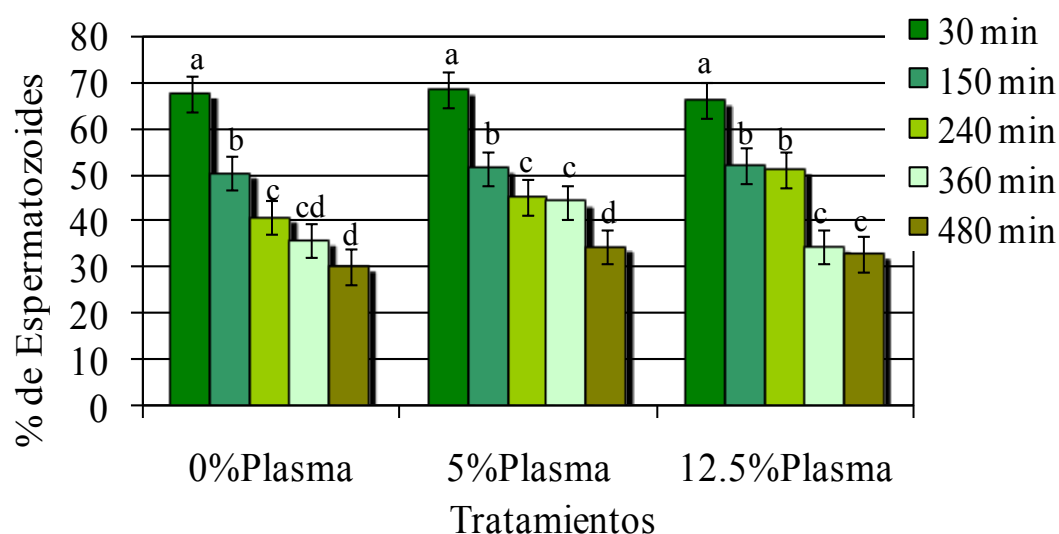


Figura 39. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides con Acrosomas Intactos
 Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

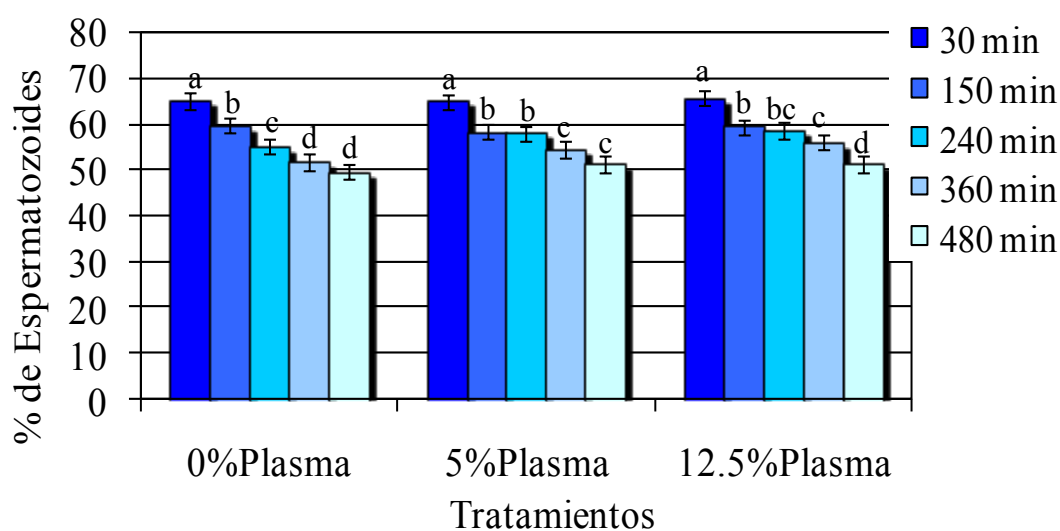


Figura 40. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides con Membrana Plasmática Intacta
 Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

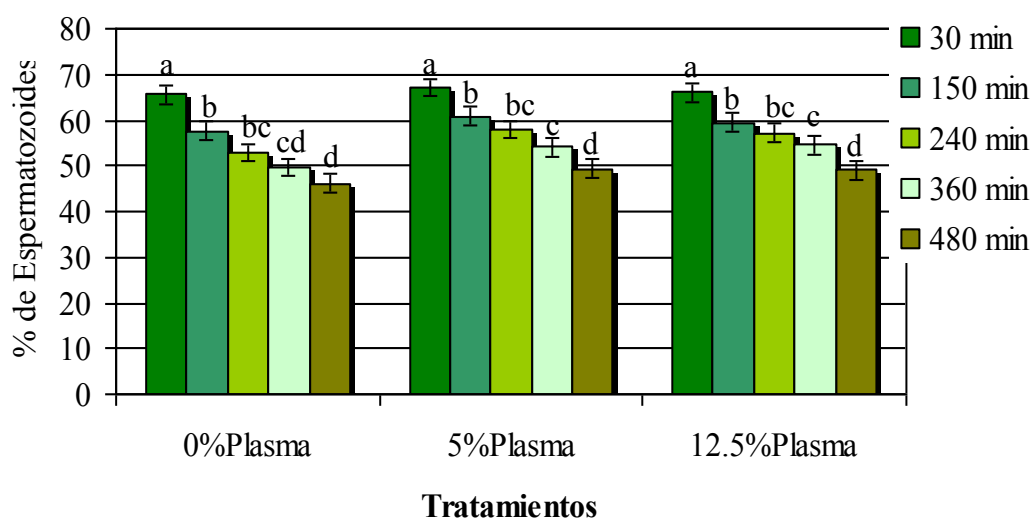


Figura 41. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Vivos con Actividad Mitocondrial
Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

La evolución en el tiempo en los diferentes tratamientos fue muy similar entre ellos, observándose una ligera mejoría en el porcentaje de EAN en periodos intermedios para los tratamientos con plasma seminal; sin embargo, en el resto de los parámetros de viabilidad EMPI y EVAMI, la evolución de los diferentes diluyentes fue similar al control a lo largo del tiempo.

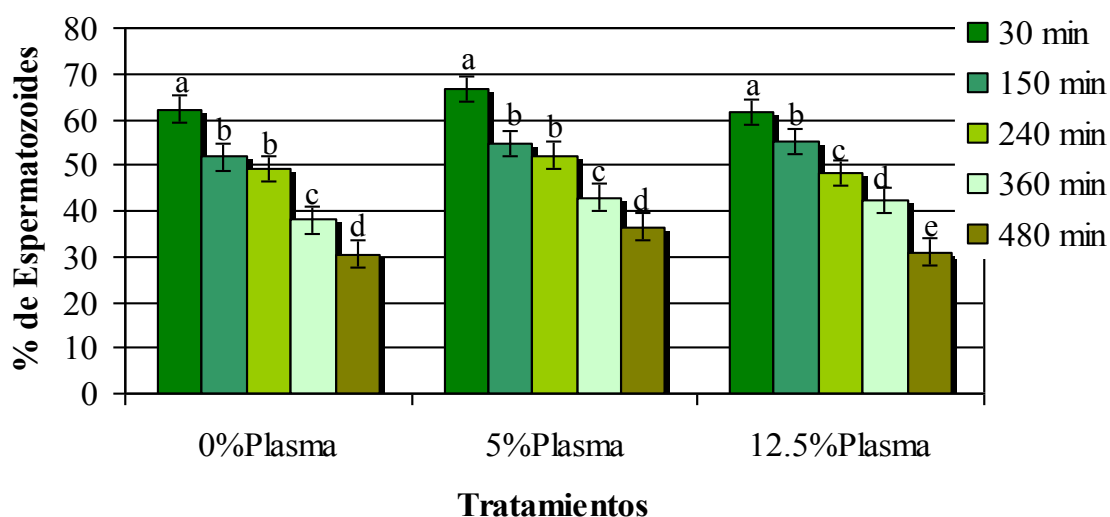


Figura 42. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales
Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

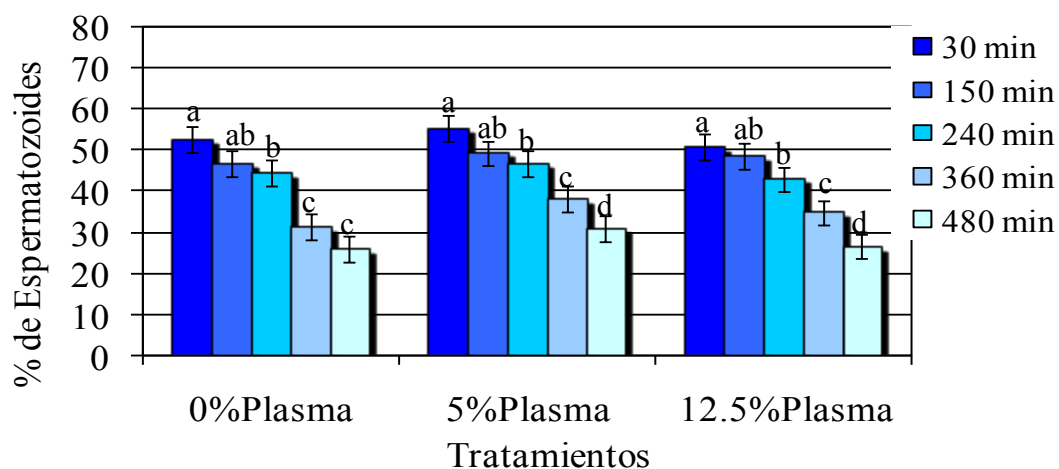


Figura 43. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Progresivos
 Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

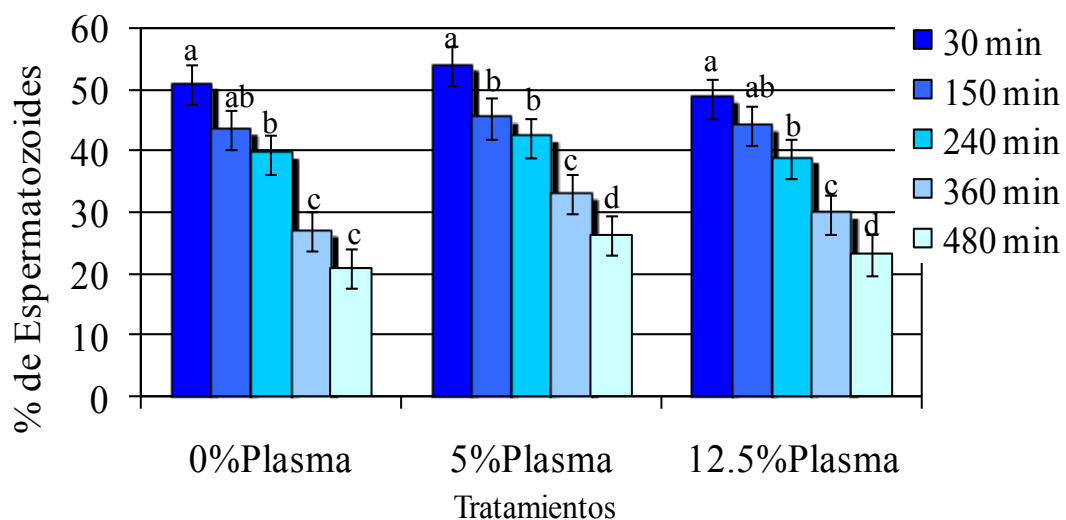


Figura 44. Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Progresivos Rápidos
 Letras diferentes entre tiempos en el mismo tratamiento, implica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los distintos tratamientos para los diferentes parámetros de motilidad se comportaron de manera similar. La inclusión de plasma seminal en el medio post-descongelación no presentó diferencias tan claras para motilidad como en la experiencia anterior (2B).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. Experiencia 1: Caracterización bioquímica y funcional del eyaculado de cerdo Ibérico y estudio de su congelabilidad. Uso del ChemSensor como herramienta discriminatoria de la congelabilidad entre machos según el perfil de fracciones másicas de volátiles y ácidos grasos.

6.1.1. Determinación de la congelabilidad y clasificación de los eyaculados.

Para la clasificación de los eyaculados se usó un análisis jerárquico por clusters (Statgraphics 15.2.12., StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia, USA) similar al usado por Cerolini *et al.*, 2001, con ligeras modificaciones. Al igual que en un estudio llevado a cabo por Roca *et al.*, 2006, solo se tuvieron en cuenta como variables de discriminación, el porcentaje de espermatozoides vivos totales y el porcentaje de espermatozoides móviles totales. La inclusión de más parámetros de calidad seminal, disminuía considerablemente el coeficiente de correlación del análisis (R^2) y aumentaba el número de datos extremos o “outliers”, tanto por encima como por debajo de la media del total de los datos, impidiendo una buena clasificación de los eyaculados. Además, de forma similar al estudio de Gil *et al.*, 2005 solo se usaron los valores de estos parámetros medidos a los 30 minutos post-descongelación, siendo considerados suficientes para determinar la calidad del semen post-descongelación.

En cuanto al número de grupos de clasificación, se optó por clasificar los eyaculados en función de 2 grupos de congelabilidad, buenos y malos congeladores,

observándose diferencias significativas entre ellos ($P < 0,05$) (Aurich *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 2005), y no 3 grupos de congelabilidad (buenos, malos y moderados congeladores) como consideran otros autores (Cerolini *et al.*, 2001; Roca *et al.*, 2006).

Aunque la clasificación por clusters permite la discriminación de los tres grupos de congelabilidad, el bajo número de muestras de las que se disponía hacía más adecuada la clasificación en solo dos grupos, para que su posterior discriminación fuera significativa (Praisler *et al.*, 2000; Berlioz *et al.*, 2006; Laguerre *et al.*, 2007). Además, en experiencias previas se observó que los animales considerados como buenos congeladores eran siempre los mismos, independientemente de que fueran clasificados en 2 ó 3 grupos de congelación, mientras que los considerados como moderados son integrados en el grupo de los malos al clasificarlos en solo 2 grupos. Esto parece indicar que los animales considerados como buenos congeladores se pueden diferenciar claramente del resto y que los supuestos moderados pueden comportarse como malos y viceversa. Hecho contrastado posteriormente con el uso del ChemSensor.

6.1.2. Relación entre la composición de volátiles en semen y su resistencia a la congelabilidad.

El estudio de los componentes volátiles es una técnica habitual en la investigación de la calidad de los alimentos (Olsson *et al.*, 2000; Radovic *et al.*, 2001; Ansorena *et al.*, 2001; Landaud 2008; Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2009). La nariz electrónica (cromatógrafo Gases/Masas) no solo permite determinar qué compuestos aromáticos tiene un alimento (Radovic *et al.* 2001; Ansorena *et al.*, 2001; Landaud 2008), el estado de curación de embutidos (Ruiz *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2006) o la calidad organoléptica del vino (Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2009), sino que también es

una herramienta capaz de discriminar entre una muestra contaminada con hongos de una que no lo está (Olsson *et al.*, 2000), constituyendo una técnica de discriminación y clasificación muy eficaz.

Se sabe que el semen de verraco tiene un olor característico, conferido por la feromona androstenona. Esta feromona sexual se ubica de forma general en el grupo de los andrógenos, responsable de la estimulación de respuestas sexuales en la cerda, antes y durante la monta (Patterson y Monttram, 1974). Es sintetizada en las células de Leydig de los testículos y se transporta por sangre, acumulándose una parte, de manera reversible, en el tejido adiposo; confiriendo un olor y sabor característico a la carne del cerdo (Robic *et al.*, 2008). Otra parte, sin embargo, se elimina por la saliva, la orina o se cataboliza en el hígado.

La clara capacidad de discriminación de este equipo observada mediante el estudio de los componentes volátiles en los alimentos y el potencial oloroso del semen, hizo pensar que el estudio de los componentes volátiles del mismo semen podría servir como un método para determinar de una forma rápida y precisa, si una muestra de semen sería apta o no para ser congelada, tratando de correlacionar la proporción de alguno de estos componentes con la congelabilidad del macho.

Los resultados obtenidos muestran que los componentes volátiles detectados en semen de porcino son muy escasos, en comparación con los obtenidos en análisis de otras materias primas (Ansorena *et al.*, 2001, Martín *et al.*, 2006., Radovic *et al.*, 2001 y Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2009). Además, el componente mayoritario es el “Hexano”, con un porcentaje del 93%, mientras que los componentes mayoritarios posteriores son compuestos ciclados como: octametil ciclotetrasiloxano, decametil ciclopentasiloxano, decametil ciclohexasiloxano y tetradecametil cicloheptasilosano que están en porcentajes comprendidos entre un 2-3%, pero se trata de componentes residuales de la

columna de cromatografía, y los demás componentes detectados están en una proporción inferior a estos últimos, pudiéndose considerar como compuestos poco relevantes debido a su baja proporción. Tras el análisis de los resultados, ninguno de los componentes detectados fue significativamente diferente entre grupos de congelación y se determinó que el estudio de los compuestos volátiles en el semen de cerdo Ibérico previo a la congelación, no aporta ninguna información sobre la futura congelabilidad de las muestras seminales.

6.1.3. Extracción lipídica en semen de cerdo Ibérico

6.1.3.1. Extracción de lípidos en pellet de espermatozoides

Las membranas celulares sufren daños durante el proceso de crioconservación y la reversibilidad de estos daños varía con la composición de dicha membrana (Quinn, 1989). Además, la composición lipídica se ha considerado como parcialmente responsable de la sensibilidad de las diferentes especies al choque por frío (Watson, 1981; Parks y Lynch, 1992). El proceso de crioconservación espermática altera la fluidez de distintos dominios lipídicos en la membrana (Buhr, 1991), alterando la composición y la dinámica de los dominios lipídicos de la cabeza de la membrana plasmática del espermatozoide (Pettitt y Buhr, 1998).

Las diferencias en la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide se considera como un factor clave en la congelabilidad espermática (Parks y Lynch, 1992). En muchas especies de mamíferos, más del 60% del total de los ácidos grasos de la membrana espermática son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Bannon *et al.*, 1985; Bennet *et al.*, 1987). La presencia de estos ácidos grasos

confiere una composición muy específica con una gran fluidez debida a la presencia de varios dobles enlaces (Bradford, 1976; Yeagle, 1992), siendo esta gran fluidez la que podría dar una mejor resistencia al daño surgido por la formación de cristales de hielo durante la congelación (Madjian *et al.*, 2005; Waterhouse *et al.*, 2006).

En este estudio se observó que la composición de ácidos grasos de la membrana del espermatozoide de cerdo Ibérico era similar a lo reportado en estudios previos en porcino de capa blanca (Poulos *et al.*, 1973; Paulenz *et al.*, 1995; Cerolini *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2006) con pequeñas diferencias, como una proporción muy baja de C22:5 (DPA). Estas diferencias pueden ser debido a la propia raza del cerdo Ibérico. Esta raza posee en sus músculos una composición grasa muy diferente de la de otras razas de cerdo blanco (Daza *et al.*, 2007), y su mayor capacidad adipogénica podría también influir en la composición de las membranas celulares, en este caso la del espermatozoide. Además no hay ningún estudio comparativo de la composición lipídica de la membrana del espermatozoide de cerdo Ibérico con otras razas de porcino, pero en otras especies si se ha observado una gran diferencia entre razas diferentes de una misma especie (Miller *et al.*, 2005).

De forma general, en porcino, comparado con las células somáticas, la membrana plasmática del espermatozoide tiene altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, en particular de DPA (C22:5) y DHA (C22:6) siendo estos ácidos grasos identificados como los predominantes en las membranas espermáticas de cerdo (Poulos *et al.*, 1973, Parks y Lynch, 1992). Variaciones en la proporción de DHA y DPA se han asociado con diferencias en la criotolerancia en el semen de elefante africano y asiático (Swain y Miller, 2000), en zorros azules y plateados (Miller *et al.*, 2005) y en marsupiales como los wombats (*Vombatus ursinus*), canguros grises (*Macropus giganteus*) y koalas (*Phascolarctos cinereus*; Miller *et al.*,

2004). Pero los resultados obtenidos en este estudio contradicen lo obtenido en estas especies. Solo se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de congelabilidad en el ácido graso C12:0, el cual es un ácido graso saturado. También se observó que la cantidad relativa de C22:5 era muy inferior a lo relatado en ensayos de otros autores (Poulos *et al.*, 1973; Paulenz *et al.*, 1995; Cerolini *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2006), pero esta carencia de C22:5 en las membranas del espermatozoide de cerdo Ibérico puede ser debida a diferencias en la composición lipídica de la dieta (Rooke *et al.*, 2001) o a diferencias en el procedimiento de extracción, ya que estos métodos varían entre laboratorios y la cantidad y el número de ácidos grasos detectados varia mucho entre autores (Canvin y Buhr, 1989).

Asimismo el ácido graso C12:0, al estar presente en baja proporción muchos trabajos ni siquiera lo detectan o lo tienen en cuenta (Cerolini *et al.*, 2001). El bajo interés de algunos autores en este ácido graso hace presuponer su baja importancia en la resistencia a la crioconservación.

En lo que se refiere a los grupos de congelación, Cerolini *et al.*, (2001) y Madjan *et al.*, (2005) demostraron que no existían diferencias significativas en la composición de ácidos grasos de las membranas entre grupos de buenos, malos y moderados congeladores, ni antes ni después de la congelación. Estos autores solo observaron que después del proceso de congelación había un aumento en la cantidad de lípidos totales, pero por igual entre grupos de congelabilidad. Esta ganancia de lípidos ocurre durante la incubación con la yema de huevo del diluyente de congelación, de forma pasiva y/o por una activación celular del metabolismo de transferencia o síntesis lipídica (Cerolini *et al.*, 2001).

Este estudio trató de determinar si la composición inicial de ácidos grasos de las membranas plasmáticas de cerdo Ibérico tenía relación con la congelabilidad del semen,

ya que esta composición lipídica inicial podría afectar parcialmente a la supervivencia criogénica de los espermatozoides (De Leeuw, 1991; Parks y Lynch, 1992). De esta manera, White (1993) determinó que la resistencia al choque por frío estaba relacionada con altos niveles de esteroides en la membrana y un bajo ratio de ácidos grasos insaturados/saturados. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en este ensayo, donde no hubo diferencias entre los grupos en el ratio insaturados/saturados, ni en el porcentaje de ácidos grasos insaturados o saturados. Estos mismos resultados, en desacuerdo con la hipótesis de White, han sido determinados en porcino (Cerolini *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2006) y en wombats, canguros grises y koalas (Miller *et al.*, 2004). Así se puede determinar que, según este estudio, en el cerdo Ibérico no existe una relación entre la composición en ácidos grasos de la membrana plasmática del espermatozoide, con su futura congelabilidad.

6.1.3.2. Extracción de lípidos en plasma seminal

La composición lipídica del plasma seminal difiere mucho de la composición de la membrana espermática, especialmente en la proporción de ácidos grasos insaturados. En el plasma seminal predominan los ácidos grasos monoinsaturados como el C18:1 (ácido oleico) y aumentan también los saturados C18:0 (ácido esteárico) y C16:0 (ácido palmítico). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores como Rooke *et al.* (2001), que observaron una menor cantidad en el contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en el plasma seminal respecto a los de la membrana plasmática.

El origen de los lípidos del plasma seminal de verraco no está claramente establecido, pueden ser lípidos desprendidos de las membranas de los espermatozoides y de las células del tracto reproductivo o lípidos sintetizados en las glándulas accesorias para estar disueltos en el plasma seminal. Estudios recientes han demostrado que la composición lipídica del plasma seminal puede deberse a la presencia de gránulos y vesículas membranosas (Piehl *et al.*, 2006). Estas vesículas fueron por primera vez descritas en plasma seminal de humano por Ronquist *et al.*, (1978), posteriormente fueron denominadas como prostasomas, y fueron descritos como pequeñas vesículas multilaminares con un diámetro medio de 150 nm, pero con una gran variación en sus tamaños (Ronquist y Brody, 1985; Fabiani, 1994), siendo bien diferenciadas de las gotas citoplasmáticas tanto por su tamaño como por su composición.

Se ha demostrado que estos prostasomas en la especie humana están envueltos en varias funciones biológicas con actividad inmunosupresora (Kelly *et al.*, 1991; Skibinski *et al.*, 1992), participan en la licuefacción del semen (Fabiani, 1994), se les ha conferido actividad antioxidante (Saez *et al.*, 1998) e interacción con el espermatozoide (Ronquist *et al.*, 1990; Arienti *et al.*, 1997; Carlini *et al.*, 1997) para promover la motilidad (Fabiani *et al.*, 1994; Arienti *et al.*, 2004). La presencia de estos prostasomas en el plasma seminal ha sido observada en varias especies de mamíferos como ratas (Fornes *et al.*, 1991), conejos (Minelli *et al.*, 2003), moruecos (Breitbart y Rubinstein, 1982), caballos (Arienti *et al.*, 1998) y recientemente en cerdos (Piehl *et al.*, 2006), siendo morfológicamente similares entre especies (Kelly *et al.*, 1991; Arienti *et al.*, 1998; Piehl *et al.*, 2006). Estas vesículas contienen gran cantidad de colesterol y esfingomielina, confiriéndolas una composición lipídica inusual en comparación con muchas de las membranas biológicas (Arvidson *et al.*, 1989; Arienti *et al.*, 1998; Piehl *et al.*, 2006). Dicha composición difiere significativamente de la de la membrana del

espermatozoide tanto en su composición lipídica como en el orden molecular de los lípidos, lo que sugiere que esas vesículas podrían estar envueltas en la estabilización de la membrana espermática y podrían jugar un papel importante en la respuesta a la crioconservación espermática (He *et al.*, 2001).

En este trabajo se ha tratado de determinar si la composición lipídica del plasma seminal previa a la congelación, puede tener o no una relación con la crio-supervivencia espermática de cerdo Ibérico. Aunque se ha observado una diferente composición en ácidos grasos en comparación con la de la membrana del espermatozoide, posiblemente debida a la presencia de estas vesículas, no se ha observado ninguna diferencia significativa en composición lipídica, entre los animales que congelan bien de aquellos que no. Esto hace pensar que a pesar de la posible presencia de estas vesículas, éstas no se relacionan con la respuesta a la congelación de los espermatozoides de porcino Ibérico.

6.1.4. Análisis del plasma seminal por electroforesis capilar

Recientemente, se han realizado estudios para diferenciar verracos (Sellés *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006) y eyaculados (Gil *et al.*, 2005) con una buena o mala congelabilidad, basándose sobre todo en la estructura de la cromatina y la fertilidad *in vitro* del semen congelado. Sin embargo, los estudios realizados a este respecto, tratando de relacionar la congelabilidad del semen con parámetros previos a la congelación, han sido poco esperanzadores (Roca *et al.*, 2006). En este sentido, el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide es uno de los parámetros más estudiados, pero apenas puede predecir el 36% de la varianza observada en la viabilidad post-descongelación de los espermatozoides (Peña *et al.*, 2005).

Thurson *et al.*, (2002) demostraron que existían diferencias genéticas entre verracos en lo que a su congelabilidad se refiere; hecho corroborado más tarde por Roca *et al.*, (2006), que determinaron que las diferencias genéticas individuales entre verracos explicaban el 70% de la variación en la motilidad y viabilidad post-descongelación. De esta manera, se puede presuponer que la variabilidad en la congelabilidad entre verracos debe ser reflejada en las características del semen antes de la congelación.

La composición del plasma seminal varía entre especies, así como entre machos de la misma especie (Strzezek *et al.*, 2005). Se ha observado diferentes perfiles de composición en el plasma seminal entre verracos con diferentes fertilidades *in vivo* (Flowers y Turner, 2001) y se ha sugerido que la variación en la congelabilidad entre verracos puede ser debida a la diferente composición del plasma seminal (Roca *et al.*, 2006), debido a un diferente origen genético (Thurston *et al.*, 2002). En este sentido, en otras especies se han observado diferencias en el perfil proteico del plasma seminal entre machos con alta o baja congelabilidad (Jobim *et al.*, 2004; Zahn *et al.*, 2005), quedando constatado que existen diferencias entre el plasma seminal de los buenos y los malos congeladores, ya que Aurich *et al.*, (1996) y Hernández *et al.*, (2007) observaron que el efecto del plasma seminal sobre la crio-supervivencia espermática, al añadirlo al diluyente de congelación, era dependiente de la congelabilidad del donante, determinando mejores valores de viabilidad y motilidad solo en aquellas muestras congeladas con plasma seminal de buenos congeladores. Además Caballero *et al.*, (2004) mostraron que el plasma seminal puede ejercer un efecto positivo o negativo sobre los espermatozoides de verraco altamente diluidos dependiendo de la procedencia del plasma seminal añadido.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que existe una relación entre el perfil proteico del plasma seminal del cerdo Ibérico y la congelabilidad de su semen. Al observar las bandas proteicas se determinó que, al diferenciar entre dos grupos de congelabilidad, la proporción de dos proteínas difirió significativamente entre grupos ($P < 0,05$). La proteína de 15-kDa estaba en mayor proporción en los buenos congeladores y la proteína de 25-kDa en los malos congeladores. Estos resultados concuerdan con los observados por Jobim *et al.*, (2004), que detectaron diferencias en el perfil proteico del plasma seminal procedente de toros con alta y baja congelabilidad, determinando que proteínas de un peso molecular de 15-16kDa podrían considerarse como marcadores de semen de alta congelabilidad y la proteína de 25-26kDa como un marcador de semen de baja congelabilidad. Pero también entran en conflicto con otros estudios, como el realizado por Roncoletta *et al.*, (2000), que encontraron una mayor proporción de la proteína de 25 kDa en toros considerados buenos congeladores, hipotetizando que dicha proteína era la prostaglandin D sintetasa, la cual produce modificaciones de la permeabilidad de la membrana celular y por ello podría estar implicada en el factor de congelabilidad.

Estas diferencias encontradas entre estudios pueden deberse a la diferente técnica de separación proteica usada entre autores, y a que proteínas de diferente punto isoeléctrico podrían tener un mismo peso molecular (Jobim *et al.*, 2004).

En cuanto a la banda proteica de 15 kDa encontrada, su peso molecular es similar al de las espermadhesinas (Centurión *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004). Las espermadhesinas constituyen una familia de glicoproteínas de bajo peso molecular, de entre 12 y 16 kDa, compuestas por entre 109 y 133 aminoácidos (Romero *et al.*, 1997), su expresión y síntesis se ha observado en las vesículas seminales, próstata y cola del epidídimo, incluso algunas espermadhesinas (PSP-I y PSP-II) son sintetizadas en el

testículo (Ekhlesi-Hundrieser *et al.*, 2002). Presentan la característica de unirse a la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide durante la eyaculación (Sanz *et al.*, 1992), y en el verraco están representadas por cinco miembros AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I y PSP-II.

Estas proteínas están entre los mayores componentes del plasma seminal y afectan a la funcionalidad espermática de forma significativa, siendo capaces de proteger al espermatozoide de morueco del daño por choque por frío (Barrios *et al.*, 2005). En el verraco, las espermadhesinas representan un 75% del total de las proteínas del plasma seminal y se ha observado que ciertas espermadhesinas son capaces de preservar la calidad espermática de espermatozoides altamente diluidos, mediante la estabilización de sus membranas (Centurión *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004; García *et al.*, 2006).

Tras la eyaculación, un espermatozoide presentará aproximadamente entre 10 y 60 millones de moléculas de espermadhesinas recubriendo su superficie. Las espermadhesinas previenen la reacción acrosomal prematura (Jansen *et al.*, 2001) y también actúan como receptores de moléculas de colesterol liberadas por el espermatozoide, lo que permite disminuir el ratio colesterol/fosfolípidos, fenómeno asociado con la capacitación espermática (Jonáková *et al.*, 2000). Además, las espermadhesinas presentan una afinidad por la heparina y otros glicosaminoglicanos, los cuales se han visto que promueven la capacitación en el oviducto de la cerda (Therien *et al.*, 1995; Therien *et al.*, 1997; Tienthai *et al.*, 2000). Todo esto indica que esta cubierta de espermadhesinas tiene una doble función, por un lado estabilizar la membrana del espermatozoide y por otro evitar la prematura capacitación espermática hasta el momento adecuado (Calvete *et al.*, 1996).

Nuevos estudios muestran que el porcentaje de proteínas del plasma seminal decrece después de la crioconservación (Nauc y Manjunath, 2000), la pérdida del 70-80% de las proteínas durante la congelación (Jobim *et al.*, 2004), sugiere que durante dicho proceso ocurre una modificación de la membrana del espermatozoide, pudiendo inducir una prematura capacitación de los espermatozoides congelados-descongelados (Nauc y Manjunath, 2000).

En este respecto, se podría decir que la preincubación de los espermatozoides con su plasma seminal antes de la congelación, así como la presencia de una cierta proporción de plasma seminal (10-40%) o de proteínas del mismo como las espermadhesinas (Centurión *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004; García *et al.*, 2006), en los medios de dilución podría ser capaz de aumentar la resistencia de los espermatozoides al choque por frío y de reducir e incluso revertir el estado de capacitación espermática (Pursel *et al.*, 1973; Vadnais *et al.*, 2005a). Además dependiendo de si el plasma seminal procede de un buen o mal congelador la adición del plasma seminal tendrá un efecto positivo o negativo (Caballero *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2007). Cabe la posibilidad de que la presencia de una mayor proporción de una determinada proteína en el plasma seminal durante la incubación previa a la congelación, en el caso del cerdo Ibérico podría corresponder a una proteína de 15 kDa, permitiría una mayor estabilización de las membranas espermáticas. Así, los buenos congeladores poseerán una mayor proporción de esta proteína que los malos congeladores; por ello, es posible que los buenos congeladores sean menos susceptibles al choque por frío, que los malos congeladores. Además esto también podría explicar por qué se obtienen mejores resultados de calidad espermática al usar plasma seminal de buenos congeladores en eyaculados de machos considerados malos congeladores (Caballero *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2007).

Todas estas características y su relación con la congelabilidad hacen que sea posible que en esta banda proteica encontrada, se encuentren las proteínas seminales llamadas espermadhesinas, pero no se pudo realizar ningún análisis que pudiera afirmarlo fehacientemente.

6.1.5. Utilización del ChemSensor como herramienta de discriminación entre grupos de clasificación del potencial de congelabilidad del semen de cerdo Ibérico.

Recientes estudios muestran que el estudio de compuestos volátiles con el ChemSensor puede ser usado como una alternativa a la evaluación de la autenticidad de muestras de aceite y jamón (Berlioz *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007; 2009), demostrándose también, que en diferentes alimentos el uso del ChemSensor con un espectrómetro de masas (seudonariz electrónica) como sistema de detección, permite el desarrollo de métodos rápidos de caracterización de dichos alimentos (Marsili, 1999; Peres *et al.*, 2001; 2002; Laguerre *et al.*, 2007). En el espectro de masas obtenido en estos análisis se representa cada fracción másica resultante de la separación por cromatografía. Cada fracción másica puede ser considerada como un potencial descriptor químico de una muestra y el conjunto de fracciones másicas es sujeto a un análisis multivariante (Por ejemplo PCA o SIMCA), para de esta manera obtener información cuantitativa o cualitativa que pueda predecir la calidad de una muestra (Laguerre *et al.*, 2007).

En este estudio se utilizaron muestras de extracciones de ácidos grasos de plasma seminal y de membrana plasmática de espermatozoide, así como también el perfil de volátiles analizado de las muestras de semen completo; clasificándolas

previamente por grupos de congelabilidad, para tratar de realizar un análisis discriminatorio de cada una de las muestras, mediante el estudio de las diferentes fracciones másicas obtenidas al pasar las muestras por el ChemSensor y analizarlas mediante el método SIMCA.

Los resultados obtenidos con el análisis del ChemSensor permitieron el uso de hasta 500 fracciones másicas como variables de discriminación de las muestras, entre los diferentes grupos (buenos y malos congeladores).

Debido al bajo número de muestras analizadas frente al gran número de variables obtenidas (500 fracciones másicas), la capacidad de discriminación del modelo es más baja y disminuyen las distancias de discriminación entre los grupos (Correa, 2003). Por ello, para reforzar el modelo de discriminación, se realiza una selección de las fracciones másicas obtenidas, ya que hay fracciones que poseen un mayor poder discriminante que otras según la muestra que tratemos de clasificar (Infometrix Inc., 2003), eliminando del modelo aquellas con menor capacidad discriminante.

La exclusión de aquellas fracciones másicas que poseían menor capacidad de discriminación mejoró el modelo de separación, disminuyendo el número de falsos positivos y acrecentando la distancia de discriminación entre muestras, entre los dos grupos de clasificación. Se observó que el modelo establecido con ácidos grasos del plasma seminal fue el único capaz de clasificar perfectamente todas las muestras sin obtener falsos positivos. Pero la distancia de discriminación entre muestras fue muy baja (1,37) y se considera que las diferencias entre grupos son significativas cuando las distancias entre ellos es de 3 (Busto *et al.*, 2002). En este sentido, el modelo conseguido con la muestra de volátiles de semen completo es más adecuado para la clasificación, ya que después de la exclusión de fracciones másicas, aunque aún

aparezca un animal como falso positivo, la distancia de discriminación entre las muestras es de 2,62. Dicha distancia no es una diferencia significativa al ser menor de 3 (Busto *et al.*, 2002), pero Laguerre *et al.*, (2007) obtuvieron resultados similares en un estudio de clasificación de 2 tipos de arroces, observando que mediante el método de clasificación SIMCA obtenían distancias de 2,09 y al igual que en nuestro caso, partiendo de un bajo número de muestras, por ello consideraron que esa distancia inter-clase al ser obtenida con un bajo número de muestras, aunque no significativa, si era adecuada para la discriminación.

El hecho de que las muestras analizadas de semen completo presenten mayor capacidad discriminatoria, puede ser debido a que dichas muestras incluyen tanto al espermatozoide y sus diferentes componentes celulares y de membrana, como al plasma seminal donde estaba diluido, y a que la congelabilidad del semen de porcino se cree que no viene determinada solo por un único factor (Hernández, 2007), sino que puede ser un conjunto de factores los que la determinen, entre los que se podría incluir la composición del plasma seminal, la composición de la membrana del espermatozoide e incluso la organización de los diferentes componentes en las diferentes estructuras del espermatozoide.

El modelo estudiado discrimina perfectamente los buenos congeladores; observándose que en todas las clasificaciones, los animales clasificados como buenos congeladores no dan falsos positivos en otros grupos. Estos resultados indican la existencia de diferencias substanciales en la composición bioquímica entre grupos de muestras, posiblemente debido a que los machos que congelan bien, poseen algo en su estructura celular que hace que su composición sea perfectamente discriminada, mientras que los malos congeladores pueden poseer ciertas características de los buenos congeladores y por tanto en ocasiones pueden surgir falsos positivos.

La ventaja del uso de ChemSensor y del procedimiento SIMCA es que proporcionan información estructural en base al poder discriminante. Dicho poder indica como cada una de las variables (fracciones másicas) contribuye a la discriminación entre los grupos de clasificación de congelabilidad (Laguerre *et al.*, 2007). Sin embargo, una vez que los resultados son determinados por el ChemSensor, es difícil identificar los componentes químicos responsables de cualquiera de las diferencias observadas (Berlioz *et al.*, 2006). Por ello determinar a qué compuestos o componentes corresponden estas fracciones es una labor complicada, más sabiendo que no existe ningún trabajo referencial que analice la composición de fracciones másicas del semen.

Por todo esto y al igual que lo observado por otros autores (Praisler *et al.*, 2000; Berlioz *et al.*, 2006; Laguerre *et al.*, 2007), el ChemSensor y el procedimiento estadístico SIMCA parecen ser una herramienta potencial para la rápida discriminación de muestras entre buenos y malos congeladores. Siendo posible que al aumentar el número de muestras analizadas se pudiera obtener un modelo más eficaz, con mayores distancias de discriminación, sin falsos positivos y diferenciando significativamente un grupo de otro. Además, la posibilidad de obtener un modelo capaz de determinar la congelabilidad de un eyaculado sin tener que congelarlo, descongelarlo y valorarlo, sería un gran avance para la utilización del semen congelado en la inseminación artificial porcina, ya que permitiría determinar que animales son los más adecuados para congelar sus espermatozoides y garantizar una mayor calidad a la descongelación, pudiendo así rentabilizar los machos de alto interés genético, creando bancos de espermatozoides congelados con verracos de gran interés genético o con características genotípicas o fenotípicas sobresalientes y buena calidad post-descongelación, ahorrando

gran cantidad de dinero y tiempo, al no tener que contrastar una muestra para determinar su potencial de congelación.

6.2. Experiencia 2: Optimización de los diluyentes de congelación de espermatozoides de cerdo Ibérico.

6.2.1. Discusión Experimento 1: Determinación del mejor diluyente de congelación para espermatozoides de cerdo Ibérico y estudio del efecto del *Orvus es Paste* sobre la calidad espermática post-descongelación.

En esta experiencia se trató de evaluar la importancia de los diluyentes de congelación en las características post-descongelación en espermatozoides de cerdo Ibérico y evaluar asimismo, la metodología más apropiada para la conservación de material genético del cerdo Ibérico autóctono español.

La crioconservación causa un deterioro en la viabilidad espermática en el cerdo Ibérico tras la descongelación, obteniéndose una baja tasa de supervivencia espermática (Sancho *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en esta experiencia indican que la composición del diluyente de congelación afecta claramente a la función espermática durante el proceso de crioconservación. Se observaron 2 grupos bien diferenciados, el primero incluyó el componente *Orvus es Paste* solo en el medio II de congelación presentando mejores valores post-descongelación que el otro grupo, el cual incluyó el *Orvus es Paste* en ambos medios de congelación (I y II). Dichos resultados indican que la fuente de azúcar (crioprotector no penetrante) podría afectar a supervivencia de los espermatozoides, posiblemente debido al efecto protector frente al choque por frío.

Los crioprotectores juegan un papel importante en la protección de las membranas durante el proceso de congelación y descongelación, siendo el glicerol y el *Orvus es Paste* los más usados en estos procesos en porcino, sin embargo, el mecanismo exacto de protección de estos compuestos aún no ha sido determinado.

El *Orvus es Paste* ha sido satisfactoriamente aplicado en diluyentes de congelación en cerdos (Graham *et al.*, 1971a; Pursel *et al.*, 1978a), toros (Arriola *et al.*, 1987), caballos (Martín *et al.*, 1979), ratones (Penfold *et al.*, 1993), conejos (Bamba *et al.*, 1990) y perros (Rota *et al.*, 1997) para mantener la motilidad y la integridad acrosomal; aumentando de esta manera también el porcentaje de fertilidad (Pursel *et al.*, 1978a). El compuesto activo en el *Orvus es Paste* es el Laurel Sulfato Sódico (LSS; Pursel *et al.*, 1978a) y el mecanismo responsable de su efecto crioprotector no está claramente elucidado. Este compuesto solo mejora las funciones espermáticas en presencia de la yema de huevo (Hofmo y Almid, 1991), presumiblemente porque dispersa los conglomerados lipídicos de la yema que se forman después de la dilución del semen (Strzezek *et al.*, 1984) y no por tener un efecto directo sobre la membrana del espermatozoide (Pursel *et al.*, 1978a; Pontbriand *et al.*, 1989).

Observando los parámetros de calidad espermática post-descongelación usados en esta experiencia se determinó que el efecto protector sobre los espermatozoides fue más pronunciado cuando el espermatozoide fue expuesto al *Orvus es Paste* inmediatamente antes de congelar que cuando estuvo expuesto durante el periodo de enfriamiento. Arriola y Foote (1987) determinaron que cuando los espermatozoides de toro eran congelados en presencia de LSS eran menos susceptibles al choque osmótico inducido por la adición de glicerol en un solo paso. Además, sugirieron que el LSS podría tener un efecto directo sobre la membrana espermática. Sin embargo, Peña *et al.*, (2000) indicaron que si el LSS tuviera algún efecto directo sobre la membrana del espermatozoide, lo más probable es que fuera un efecto negativo, sugiriendo que una exposición prolongada del LSS o del LSS con lipoproteínas de la yema confiere una excesiva fluidez a la membrana plasmática, lo que indicaría que el efecto beneficioso de esta sustancia dependerá del tiempo de exposición y de la concentración.

Pursel *et al.*, (1978a) determinaron que entre 0,5 – 1,5% de *Orvus es Paste* era la concentración óptima para mantener la motilidad e integridad acrosómica. En esta experiencia la concentración de *Orvus es Paste* en el diluyente no fue mayor de 1,5%, indicando que el efecto negativo en los diluyentes con *Orvus es Paste* en los 2 medios (I y II) estaba relacionado con el tiempo de exposición. Los espermatozoides expuestos al *Orvus es Paste* durante el periodo de enfriamiento tuvieron una menor supervivencia celular y peores parámetros de motilidad post-descongelación que aquellos expuestos al *Orvus es Paste* solo antes de la congelación. De hecho, los detergentes (incluido el LSS) poseen un efecto espermicida (Pursel *et al.*, 1978a, Helenius *et al.*, 1974), pero en periodos cortos de exposición el efecto crioprotector prevalece, mientras que en periodos largos podría causar la muerte celular.

Los resultados obtenidos en esta experiencia indican una posible influencia de la fuente de azúcar como crioprotector no penetrante en los parámetros post-descongelación, sin embargo la diferente composición de cada uno de los diluyentes de congelación hace complicada su interpretación.

Los medios evaluados fueron seleccionados por haber sido usados previamente por otros autores en la crioconservación de semen de verraco (Pursel y Johnson, 1975; Westerndorf *et al.*, 1975; Thilmant, 1997). Los diluyentes con base de glucosa y lactosa (Pursel-1 y Westendorf-1), son utilizados de forma habitual en trabajos de investigación, mientras que el diluyente con base de fructosa (Thilmant-2; Thilmant, 1997) se recomienda como el más apropiado para la congelación de semen de cerdo Ibérico (Serenio *et al.*, 2003).

Woelders *et al.*, (1997) mostraron que los azúcares ayudan a proteger los espermatozoides contra los daños inducidos por las rápidas rampas de enfriamiento, pero el efecto crioprotector de los azúcares sobre las células espermáticas podría diferir

de acuerdo al peso molecular del azúcar usado (Anchordoguy *et al.*, 1987; Molinia *et al.*, 1994). Estos crioprotectores no penetran en el interior de las células, quedando en el exterior y creando una presión osmótica, que va a inducir la deshidratación celular y por tanto, va a disminuir la formación de cristales de hielo intracelulares (Barbas y Mascarenhas, 2009). Pursel *et al.*, (1972) observaron que la composición de azúcares de los medios de congelación podría afectar al desarrollo de la resistencia al choque por frío durante la incubación. En ese estudio, los azúcares de mayor peso molecular (rafinosa, lactosa o sucrosa) proporcionaban una mayor protección de los acrosomas contra el efecto del choque por frío después de estar 5 horas incubando, que los diluyentes que contenían monosacáridos en su composición (glucosa o fructosa). La composición de los diluyentes de congelación en lo que al tipo de azúcar se refiere, es un factor muy significativo en la congelación de semen de morueco (Salamon, 1968). En ese estudio se observó que los diluyentes de congelación que contenían rafinosa y lactosa mantenían mejores grados de supervivencia celular que los diluyentes que contenían glucosa o fructosa. Confirmando así, el hecho de que los azúcares de mayor peso molecular, como la lactosa, mejoran los parámetros post-descongelación de los espermatozoides de cerdo Ibérico.

Pursel *et al.*, (1972) también determinaron que el porcentaje de acrosomas dañados después del choque por frío para los medios de congelación con fructosa era significativamente mayor que en los medios con glucosa, no existiendo diferencias en el porcentaje de espermatozoides móviles. Los resultados de esta experiencia disienten con estos resultados, ya que en este caso los medios con glucosa y fructosa (Pursel-1 y 2; Westendorf-1 y 2; con *Orvus es Paste* presente solo en el diluyente II) no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de acrosomas dañados, sin embargo mostraron diferencias significativas en los parámetros de motilidad, siendo mejor el

diluyente con glucosa (Pursel-1). Las diferencias encontradas entre diluyentes pueden ser debidas al porcentaje de glicerol de cada uno de ellos, ya que el medio con glucosa y lactosa (Pursel-1 y 2; Westendorf-1 y 2) poseían una concentración del 9% de glicerol, (concentración determinada como óptima en otros estudios de congelación espermática; Fiser *et al.*, 1993; Buhr *et al.*, 2001), mientras que el medio con fructosa (Thilmant-1 y 2) incluye un 6% (concentración usada en los medios recomendados para la conservación de las poblaciones porcinas en peligro; Thilmant, 1997; FAO 1998). Pero las diferencias encontradas entre diluyentes no tienen porque deberse a esta diferencia en la cantidad del glicerol, ya que una sola concentración de glicerol no maximiza todos los parámetros funcionales de la congelación de semen (Burh *et al.*, 2001). Así, las concentraciones de glicerol que mejor conservan una característica espermática post-descongelación son rara vez óptimas en lo que a otras características se refiere. Wilmut y Polge (1977a, 1977b) observaron que el mejor porcentaje de motilidad post-descongelación y el de integridad acrosómica eran alcanzados con concentraciones diferentes de glicerol, pero ninguna de esas concentraciones conservó una mayor fertilidad. De igual forma Almlid y Johnson (1988) encontraron que para tres parámetros de calidad espermática (motilidad, acrosomía e integridad de la membrana plasmática) cada una mejoraba con una concentración diferente de glicerol. Por tanto el diferente porcentaje de glicerol usado en los diferentes diluyentes podría haber afectado o no a los resultados post-descongelación.

En conclusión, estos resultados sugieren que en el cerdo Ibérico, el medio de congelación con lactosa y *Orvus es Paste* incluido en el diluyente II (Westendorf-1) confieren la mejor protección del espermatozoide de cerdo Ibérico frente al proceso de crioconservación. En particular, mostrando una mejora en la motilidad post-descongelación, sugiriendo que este medio de congelación resultaría ser el más

apropiado para la conservación de material genético de razas autóctonas españolas de cerdo Ibérico.

6.2.2. Experimento 2: Estudio del efecto de la inclusión del plasma seminal en el diluyente de congelación.

El presente estudio ha sido realizado para analizar los posibles efectos de la inclusión del plasma seminal en los medios de congelación, sobre la calidad espermática post-descongelación de los espermatozoides de cerdo Ibérico.

6.2.2.1. Experimento 2A: Efecto de la sustitución del agua del diluyente de congelación por plasma seminal.

La eliminación del plasma seminal es un paso necesario en el protocolo de crioconservación de espermatozoides de porcino, para concentrar la población espermática y poder resuspenderla en la proporción adecuada de diluyente de congelación (Cremades *et al.*, 2004). Pero esta eliminación conlleva la pérdida no solo del medio líquido, en el cual se encuentran inmersos los espermatozoides tras la eyaculación, sino también la pérdida de múltiples compuestos orgánicos e inorgánicos procedentes de las glándulas sexuales accesorias, del epidídimo y de los testículos (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

La capacidad que poseen los espermatozoides epididimarios de numerosas especies de fecundar ovocitos *in vitro* (Iritani *et al.*, 1978; Nagai *et al.*, 1984) hace presuponer que la función del plasma seminal secretado por las glándulas sexuales accesorias es de poca importancia. Sin embargo, en la actualidad se conoce ampliamente el importante papel que juega en el proceso de la reproducción porcina,

sirviendo como medio de transporte y de soporte metabólico de los espermatozoides durante su tránsito por el tracto genital de la hembra (Maxwell *et al.*, 2007), actuando como agente protector y regulador de la motilidad, de la capacitación prematura y del reconocimiento y unión entre gametos (Johnson *et al.*, 2000), no solo a nivel del espermatozoide sino también a nivel del tracto reproductivo de la hembra y de la fecundación.

La posibilidad de incorporar el plasma seminal en los protocolos de crioconservación de semen de especies en peligro de extinción, como pudiera ser el cerdo Ibérico, permitiría no solo conservar la genética contenida en los espermatozoides, sino también una gran cantidad de factores responsables de estabilizar las membranas (Centurión *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004; García *et al.*, 2006), evitar la capacitación espermática (Arienti *et al.*, 1997) y regular la fertilidad (Lavon y Bournsell, 1971).

En este estudio para determinar qué cantidad de plasma seminal se podría incorporar en los diluyentes de congelación, sin detrimento de las características de calidad espermática post-descongelación, se sustituyó el agua de dilución del medio de congelación por distintas proporciones de plasma seminal, tratando de esta manera de incorporar la mayor cantidad posible de plasma seminal. Estudios anteriores han mostrado que el efecto del plasma seminal añadido al medio de congelación sobre la crio-supervivencia de este tipo de células es dependiente del donador del mismo (Hernández *et al.*, 2007). De esta manera se ha visto que en algunas especies como los toros la adición de plasma seminal procedente de animales de baja fertilidad disminuye la penetración de oocitos, por parte de espermatozoides de animales con alta fertilidad (Henault and Killian 1996); y en el caso contrario en otras especies, al añadir plasma seminal de machos que producen semen de alta crio-viabilidad a otros machos que no lo

producen, aumenta la supervivencia post-descongelación de los espermatozoides de estos últimos (Aurich *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2007). Para solventar este problema, de igual manera que se realizó un pool de machos, para eliminar el efecto verraco del estudio, también se hizo un pool de plasmas seminales para eliminar el posible efecto donador.

Los resultados obtenidos pre-congelación a los 10 °C y 5 °C, muestran como al aumentar la incorporación de plasma seminal por encima del 25%, comienzan a decaer los parámetros de calidad espermática. Aunque solo el tratamiento con el 100% de plasma seminal incluido como medio de dilución, es diferente significativamente del resto en todos los parámetros, salvo en el porcentaje de acrosomas normales. También se observó un descenso, aunque no significativo, en los tratamientos que incluyen en el medio de dilución un 50 y un 75% de plasma seminal.

La caída de la calidad por encima del 25% de inclusión de plasma seminal puede ser debida al gran aumento de la osmolaridad que se observa en los diluyentes al aumentar la proporción del plasma seminal incluido. Gilmore *et al.* (1996, 1998), observaron que la incubación del semen de porcino en medios tanto hipertónicos como hipotónicos producía un descenso drástico en la motilidad y las características de la membrana plasmática. Este descenso de la calidad espermática concuerda en parte con los resultados de este estudio, observándose que al ir aumentando la osmolaridad del medio la calidad disminuye, pero estos autores establecían que la incubación en medios por encima de 350-400 mOsm/kg causaba la total pérdida de motilidad de los espermatozoides. Los resultados de esta experiencia indican que en los diluyentes con osmolaridades 511, 581 y 638 mOsm/kg (50, 75 y 100% de plasma seminal respectivamente) el descenso de la calidad es mucho menor. Las diferencias entre ambos estudios son debidas a la composición del medio utilizado, ya que se ha visto que

en algunos experimentos se obtienen resultados diferentes cuando se produce un estrés osmótico con una solución hipertónica con NaCl que con una solución de glucosa o sacarosa (Gao *et al.*, 1993; Caiza De La Cueva *et al.*, 1997). En este caso esta mayor resistencia a los medios osmóticos puede ser debido al efecto protector que ejerce el plasma seminal sobre las membranas plasmáticas (Maxwell *et al.*, 1997), o también por la presencia de la yema de huevo en su composición, la cual podría haber aumentado los límites de tolerancia osmótica al incorporar colesterol al medio de congelación que puede interaccionar con las membranas de los espermatozoides (Walters *et al.*, 2008; Tomás *et al.*, 2008).

En los resultados obtenidos post-descongelación de motilidad y viabilidad, se observa más claramente el peor rendimiento de los tratamientos con mayor cantidad de plasma seminal (50, 75 y 100%). Esto concuerda con los resultados obtenidos pre-congelación donde en el tratamiento con un 50 y un 75% de plasma seminal, se comenzaba a observar el descenso de la calidad. Resultados similares post-descongelación fueron observados por Zeng *et al.*, (2001), los cuales determinaron que en los medios de congelación se obtenían mejores resultados con medios moderadamente hipertónicos.

En esta experiencia no existieron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con un 10 y un 25% de plasma seminal, lo que hacía pensar que la inclusión de plasma seminal hasta un 25% no tendría ningún efecto en la congelación del semen de cerdo Ibérico. Pero al observar el comportamiento de estos tratamientos entre los dos periodos analizados (30 y 150 minutos) se observa como el diluyente con 25% de plasma seminal no presenta diferencias significativas a lo largo del tiempo (30 y 150 minutos), mientras que el control si. El plasma seminal debido a que posee factores decapacitantes (Eng y Oliphant, 1978; Begley y Quinn, 1982; Mortimer *et al.*, 1998)

puede prevenir la prematura capacitación espermática causada durante la congelación (Green y Watson, 2001, Kaneto *et al.*, 2002, Vadnais *et al.*, 2005b) en la que se producen daños que reducen la vida del espermatozoide y su capacidad fecundante, causando un “envejecimiento prematuro” del espermatozoide, el cual sufre alteraciones de la membrana plasmática y pérdida de la motilidad (Watson, 1995; 2000). Por tanto, la adición de una cierta cantidad de plasma seminal en el medio de congelación permitiría mantener la calidad seminal del espermatozoide crioconservado durante un periodo de tiempo más largo, tras su descongelación.

6.2.2.2. Experimento 2B: Efecto de la incubación prolongada de las muestras congeladas con plasma seminal.

La vida media con capacidad fecundante de un espermatozoide congelado-descongelado y depositado en el tracto genital de la cerda no supera las 6-8 horas (Waberski *et al.*, 1994). Por ello, en esta experiencia se realizó una incubación a 37 °C de los 2 mejores tratamientos con plasma seminal de la experiencia anterior frente al control, hasta un total de 8 horas (480 minutos), tratando de simular el tiempo que estarían dentro de la hembra.

En los resultados obtenidos en esta experiencia se observaron como a las 8 horas de incubación a 37 °C los parámetros de calidad seminal, especialmente la motilidad, se mantuvieron con valores más altos en el tratamiento con un 25% de plasma seminal que en el grupo control (0% de plasma seminal). Incluso a los 240 minutos se comienza a observar como el diluyente con un 25% de plasma seminal tiene mejores valores en el porcentaje de espermatozoides móviles. Hernández *et al.*, (2007) observaron también una mejora en la motilidad y en la viabilidad al congelar espermatozoides de porcino

con plasma seminal procedente de buenos congeladores, pero al añadir plasma seminal de malos o moderados congeladores no hallaron diferencias significativas entre éstos, el control y los buenos congeladores, en lo que se refiere a parámetros de motilidad. Según muchos autores la adición de plasma seminal afecta de manera diferente a la congelabilidad espermática, según si el plasma seminal procede de buenos o malos congeladores (Aurich *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2007), pero los resultados obtenidos en esta experiencia muestran como la incorporación de un pool de plasma seminal que evite estas diferencias entre machos, también tiene un efecto beneficioso sobre la calidad espermática post-descongelación de cerdo Ibérico.

El efecto del plasma seminal en la congelación es contradictorio. Algunos autores han encontrado efectos beneficiosos sobre la funcionalidad espermática al añadir plasma seminal a los medios de congelación y descongelación (Aurich *et al.*, 1996; Garner *et al.*, 2001; Maxwell *et al.*, 1999; Vadnais *et al.*, 2005a; Hernández *et al.*, 2007), mientras que otros autores han observado una pérdida de la calidad espermática al adicionarlo (Kawano *et al.*, 2004). Esto podría ser debido a la diferente composición y concentración de ciertas proteínas del plasma seminal encontradas entre machos de diferentes especies, individuos de una misma especie, eyaculados de un mismo macho e incluso entre las distintas fracciones de un mismo eyaculado (Killian *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 2000; Dacheaux *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004). Aunque recientes estudios realizados en porcino muestran que entre plasmas seminales de buenos y malos congeladores no existen diferencias en su composición proteica ni en su capacidad antioxidante (Hernandez *et al.*, 2007).

Debido a las diferentes composiciones del plasma seminal entre individuos, así como a los diferentes resultados encontrados entre estudios no se puede afirmar a ciencia cierta si el plasma seminal posee o no, un papel protector en la congelación de

los espermatozoides, ni si la composición del mismo influye o no en dicho papel. Además un problema añadido es que al adicionar el plasma seminal en el diluyente de congelación es difícil determinar si el posible efecto protector del plasma seminal es debido a su presencia durante la congelación o durante la incubación post-descongelación.

6.2.2.3. Experimento 2C: Efecto del plasma seminal en la descongelación e incubación prolongada

Para determinar si el efecto protector del plasma seminal era debido a su presencia en la congelación o en la descongelación se realizó esta experiencia, donde al diluyente de descongelación se le añadió un porcentaje de plasma seminal equivalente al porcentaje final de plasma seminal que poseían los tratamientos de la experiencia anterior durante su incubación post-descongelación.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran como existen diferencias con los resultados obtenidos en la experiencia anterior. En este caso a las 8 horas de incubación solo existen diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial, entre los tratamientos con plasma seminal y el grupo control. Para el resto de variables no se observaron diferencias. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vadnais *et al.*, (2005a) donde al incubar el semen post-descongelación en un diluyente con diferentes porcentajes de plasma seminal (10 y 20%) durante 8 horas, no encontraron diferencias significativas en cuanto a motilidad y viabilidad entre tratamientos. Estos autores, observaron un efecto sobre la capacitación espermática, determinando que la adición de plasma seminal revertía el efecto de capacitación del semen congelado-descongelado, pero no establecieron ninguna relación

con los parámetros de motilidad y viabilidad. La presencia de una cierta proporción de plasma seminal (10-40%) en los medios de dilución de espermatozoides es capaz de aumentar la resistencia de los espermatozoides al choque por frío y reducir e incluso revertir el estado de capacitación espermática (Pursel *et al.*, 1973; Vadnais *et al.*, 2005a). Pero el efecto que ejerce el plasma seminal sobre la funcionalidad y fertilidad de los espermatozoides ofrece resultados contradictorios. Mientras que algunos autores aseguran que puede reducir la funcionalidad y fertilidad espermática (Dott *et al.*, 1979; Kawano *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2005; Akcay *et al.*, 2006), otros autores afirman que su adición estabiliza la célula evitando que se produzca el proceso de capacitación, mejorando así la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Ashworth *et al.*, 1994; Henault y Killian, 1996; Maxwell y Johnson, 1999; Barrios *et al.*, 2000; Garner *et al.*, 2001; Vadnais *et al.*, 2005a; 2007).

En el caso de esta experiencia la adición del plasma seminal al medio de descongelación no mejoró los parámetros de calidad espermática, pero tampoco los empeoró, aún así esto hace determinar que el mayor efecto protector del plasma seminal fue durante la congelación (experiencia 2b2).

De forma general en las 3 experiencias se deduce que una concentración excesiva de plasma seminal es perjudicial para la congelación espermática de cerdo Ibérico, muy posiblemente debido a la mayor osmolaridad del medio. Además se ha determinado que el efecto beneficioso de la adición del plasma seminal reside en su inclusión en el medio de congelación, estando así, presente en todo el proceso de enfriamiento-congelación-descongelación.

Este mayor efecto protector del plasma seminal al estar presente en el diluyente de congelación, puede ser debido a que durante el proceso de enfriamiento aporta una mayor resistencia de los espermatozoides al llamado choque por frío (Pursel *et al.*,

1973; Maxwell *et al.*, 1999). Este efecto protector podría ser debido a varios factores entre los que se encontrarían, mayor estabilidad de la membrana durante el proceso de enfriamiento y congelación, donde gran cantidad de factores pueden ser responsables de estabilizar dichas membranas (Arienti *et al.*, 1997), capacidad de evitar la capacitación espermática mediante diversos factores decapacitantes que alargan la longevidad de los espermatozoides disminuyendo los cambios estructurales y fisiológicos que tienen lugar durante la crioconservación (Maxwell y Johnson, 1999; Barrios *et al.* 2000) o al efecto de diversas proteínas como pudieran ser el heterodímero PSP-I/PSP-II, que constituye una de las espermadhesinas más abundantes del plasma seminal que expuesta durante periodos cortos de tiempo al semen fresco o congelado-descongelado preserva (o mejora) la viabilidad, motilidad espermática (Caballero *et al.*, 2004) y la actividad mitocondrial (Centurión *et al.*, 2003).

De esta manera se sabe que la adición de plasma seminal en cantidades adecuadas, puede proteger a los espermatozoides de procesos como la crioconservación (Berger y Clegg, 1985; Ollero *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2007), las altas diluciones (Maxwell y Johnson, 1999; Centurión *et al.*, 2003) o a procesos de separación espermática por citometría de flujo (Maxwell y Johnson, 1998; Caballero *et al.*, 2004), al permitir la estabilización de las membranas espermáticas. Por lo tanto, y por todo lo anteriormente expuesto, la adición de plasma seminal o de alguno de sus componentes en los medios de congelación de espermatozoides de semen de cerdo Ibérico, podría alargar la longevidad de los espermatozoides mediante la unión de estos factores a la membrana plasmática inhibiendo, en cierto grado, cambios estructurales y fisiológicos (Fraser *et al.*, 1990; Maxwell y Johnson 1999; Barrios *et al.*, 2000) y permitiendo aumentar el número de espermatozoides asociados a las células epiteliales del oviducto, creando un mayor reservorio espermático. De esta manera, un mayor depósito de

esperma funcional en el tracto reproductivo de la hembra, mejoraría la fertilidad del semen congelado, siendo en el caso de la crioconservación de semen de animales en peligro de extinción, como el cerdo Ibérico, una mejora muy importante en los protocolos de conservación de recursos zoogenéticos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- El estudio de compuestos volátiles en el semen de porcino Ibérico, no aporta la información necesaria para ser utilizado como técnica discriminatoria entre machos buenos y malos congeladores, previa a la crioconservación espermática.
- En el plasma seminal existe una mayor proporción de una familia de proteínas de 15 kDa, en aquellos machos con buena calidad espermática post-descongelación. Por tanto, su presencia puede estar relacionada con la mejor congelabilidad de dichos machos.
- El estudio previo a la congelación, de la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide y del plasma seminal, no parecen tener relación con la futura resistencia a la congelabilidad de los espermatozoides de cerdo Ibérico.
- El estudio de la composición de fracciones másicas del semen de cerdo Ibérico mediante el ChemSensor, podría ser una herramienta adecuada para la discriminación previa de los eyaculados en lo que respecta a su futura congelabilidad.
- De los tres diluyentes definidos estudiados, el diluyente más adecuado para la crioconservación de espermatozoides de cerdo Ibérico es el medio Westendorf-1 constituido por lactosa como crioprotector no penetrante, y el cual solo incluye el detergente *Orvus es Paste* (1,5 %) en el diluyente II.

- La sustitución de un 25% del agua del medio de congelación, por plasma seminal, se considera la proporción máxima que se puede incorporar para la conservación junto con los espermatozoides, sin que éste sufra daños. Además dicha proporción protege a los espermatozoides de cerdo Ibérico durante el proceso de congelación-descongelación y permite mantener la calidad espermática durante más tiempo.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

8. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de las Partes de un Espermatozoide	38
Figura 2: Corte Transversal de la Cola del Espermatozoide	39
Figura 3: Esquema Funcionamiento del ChemSensor	53
Figura 4: Centrífuga Refrigerada	69
Figura 5: Baño Termostático Programable	69
Figura 6: Envasadora y Selladora de Pajuelas	70
Figura 7: Biocongelador Programable	70
Figura 8: Curva de congelación	70
Figura 9: Descongelación	71
Figura 10: Dilución en BTS	71
Figura 11: Evaluación de la Motilidad, Sistema SCA	72
Figura 12: Valoración de la Viabilidad	74
Figura 13: Espermatozoide Vivo	74
Figura 14: Espermatozoide Muerto	74
Figura 15: Espermatozoide con el Acrosoma Intacto	75
Figura 16: Espermatozoide con el Acrosoma Alterado y/o Dañado	75
Figura 17: Espermatozoide Vivo con Actividad Mitocondrial	76
Figura 18: Esquema de Separación de Lípidos por Centrifugación	78
Figura 19: Concentrador de Muestras	78
Figura 20: Cromatógrafo de Masas	80
Figura 21: Cromatograma de Ácidos Grasos	80
Figura 22: Bioanalizador Agilent 2100	82
Figura 23: Chip de Análisis Proteico	82
Figura 24: Estación de Cargado	83
Figura 25: Esquema del Chip de Análisis Proteico	85
Figura 26: Electroferograma	86
Figura 27: Representación Digital de la Electroforesis	86
Figura 28: Cromatógrafo de Gases-Masas	88
Figura 29: Cromatograma de Compuestos Volátiles	88

Figura 30: ChemSensor	90
Figura 31: Gráfica de Abundancia de Cada Fracción Másica	91
Figura 32: Gráfica del Potencial Discriminante de Cada Fracción Másica	91
Figura 33: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides con Acrosomas Intactos	128
Figura 34: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides con Membrana Plasmática Intacta	128
Figura 35: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Vivos con Actividad Mitocondrial	129
Figura 36: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales	129
Figura 37: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Progresivos	130
Figura 38: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Progresivos Rápidos	130
Figura 39: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides con Acrosomas Intactos	134
Figura 40: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides con Membrana Plasmática Intacta	134
Figura 41: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Vivos con Actividad Mitocondrial	135
Figura 42: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales	135
Figura 43: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Progresivos	136
Figura 44: Gráfica del Porcentaje de Espermatozoides Móviles Progresivos Rápidos	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentaje de Fosfolípidos de la Membrana de Espermatozoides de Diferentes Especies (White y Darin-Bennett, 1976)	45
Tabla 2: Composición del Diluyente Belstville Thawing Solution (BTS)	65
Tabla 3: Composición de los Medios de Congelación	66
Tabla 4: Ácidos Grasos Identificados en el Pellet de Espermatozoide y en Plasma Seminal	81
Tabla 5: Compuestos Volátiles Identificados	89
Tabla 6: Distribución del <i>Orvus es Paste</i> en Función del Diluyente I o II	96
Tabla 7: Composición de los Diluyentes donde se Sustituye el Agua por Plasma seminal	98
Tabla 8: Medias de Corte de la Clasificación de la Congelabilidad para Muestras de semen completo	106
Tabla 9: Medias de Corte de la Clasificación de la Congelabilidad para Muestras de Pellet de Espermatozoides (Post-centrifugación)	107
Tabla 10: Medias de Corte de la Clasificación de la Congelabilidad para Muestras de Plasma Seminal	107
Tabla 11: Porcentaje de Ácidos Grasos en Pellet de Espermatozoides	109
Tabla 12: Porcentaje de Ácidos Grasos en Plasma Seminal	110
Tabla 13: Porcentaje de Bandas Proteicas	111
Tabla 14: Clasificación con Exclusión de Fracciones Másicas en Función de su Congelabilidad, para Muestras de Volátiles del Semen Completo, Ácidos Grasos de Membrana y del Plasma Seminal	113
Tabla 15: Distancias con Exclusión de Fracciones Másicas en Función de su Congelabilidad, para Muestras de Volátiles del Semen Completo, Ácidos Grasos de Membrana y del Plasma Seminal	114
Tabla 16: Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta y Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta	117
Tabla 17: Porcentaje de Espermatozoides Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos a los 30 y 150 minutos Post-descongelación	118
Tabla 18: Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta, Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta, Móviles Totales,	121

Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos Pre-congelación

Tabla 19: Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta, Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta, Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos a los 30 y 150 minutos Post-descongelación 123

Tabla 20: Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta, Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta, Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos a los 30, 150, 240, 360 y 480 minutos Post-descongelación 126

Tabla 21: Porcentaje de Espermatozoides con Acrosoma Intacto, Membrana Plasmática Intacta, Vivos con Actividad Mitocondrial Intacta, Móviles Totales, Móviles Progresivos y Móviles Progresivos Rápidos 30, 150, 240, 360 y 480 minutos Post-descongelación 132

BBIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, R.J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction Fertility and Development*, 7, pp.659-68.
- Akcay, E., Reilas, T., Andersson, M. and Katila, T. 2006. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *The Journal of Veterinary Medicine*, 53, pp.481-5.
- Almlid, T. and Hofmo, P.O. 1996. A brief review of frozen semen applications under Norwegian AI swine conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 31, pp.169-73.
- Almlid, T. and Johnson, L.A. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *Journal of Animal Science*, 66, pp.2899-905.
- Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., and Crowe, J.H., 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24, pp.324-31.
- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I. and Bello, J. 2001. Analisis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. *Food Research Internacional*, 34, pp.67-75.
- Aparicio Macarro, J.B. 1988. El Cerdo Ibérico. *Premio de investigación 1987*, convocado por Sánchez Romero Carvajal Jabugo S.A. Huelva.
- Arav, A., Pearl, M. and Zeron, Y. 2000. Does membrana lipid profile explain chilling sensitivity and membrana lipid phase transition of spermatozoa and oocytes?. *CryoLetters*. 21, pp.179-86.
- Arienti, G., Carlini, E. and Palmerini, C.A. 1997. Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *Journal of Membrane Biology*, 155, pp.89-94.
- Arriola, J. and Foote, R.H. 1987. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *Journal of Dairy Science*, 70, pp.1664-70.
- Ashworth, P.J.C., Harrison, R.A.P., Miller, N.G.A., Plummer, J.M. and Watson, P.F. 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development*, 6, pp.173-80.

- Aurich, J.E., Kühne, A., Hoppe, H. and Aurich, C. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, 46, pp.791–97.
- Axner, E., Hermansson, U. and Linde-Forsberg, C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal sperm. *Animal of Reproduction Science*, 84, pp.179–91.
- Bamba, K. and Adams, C.E., 1990. Freezing rabbit semen by the use of BF5 diluent. *Laboratory Animal*, 24, pp.172-5.
- Bannon, J.C.D., Craske, J.D. and Hilliker, J.A.E. 1985. Análisis of fatty acid methyl ester with high accuracy and reliability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 62, pp.1501-7.
- Barba, C., Camacho, M.E., Peinado, B., Cabello, A., y Delgado, J.V. 2000. Programas de conservación in situ en España. *Porci*, 61, pp.37-46.
- Barbas, J.P. and Mascarenhas R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Banking*, 10, pp.49-62.
- Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J.A. 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. *Journal of Andrology*, 26 pp.539-49.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J.A. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63, pp.1531-37.
- Bathgate, R., Maxwell, W.M. and Evans, G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, pp.68-73.
- Begley, A.J. and Quinn, P. 1982. Decapacitation factors in semen. *Clinical Reproduction and Fertility*, 1, pp.167–75.
- Bennet, P.J., Moatti, J.P., Mansat, A., Ribbes, H., Cayrac, J.C. Pontonnier, F., Chap, H., and Douste-Blazy, L. 1987. Evidence for the activation of phospholipases during the acrosoma reaction of human sperm elicited by calcium ionophore A23187. *Biochimica et Biophysica Acta*, 919, pp.255-65.

- Berlitz, B., Cordella, C., Cavalli, J.F., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A.M. and Fernández, X. 2006. Comparison of the Amounts of Volatile Compounds in French Protected Designation of Origin Virgin Olive Oils. *Journal of the Agricultural Food Chemistry*, 54, pp.10092-101.
- Berrocal Rangel, L., Caso Amador, R., Oyola Fabián, A., y Salguero Maron, A. 1995. Estudios de arqueozoología y etnohistoria: el cerdo en la antigüedad del occidente europeo. El cerdo Ibérico. En: *II Encuentro intersectorial. Fregenal de la Sierra. Ed. Fondo e Educación y Promoción de la Caja Rural de Extremadura*. Badajoz. 273 pg. España.
- Berthelot, F., Martinat-Botté, F., Locatelli, A. y Terqui, M. 2000. Cryoconservation de embrions porcins ages de 5 à 6 jours en utilisant une méthode de refroidissement ultra-rapide: la méthode Open Pulles Straw (OPS). *Journées de Recherche Porcine en France*, 32, pp.433-37.
- Bervers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W., Harmsma, M. and Zwaal, R.F. 1998. Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. *Lupus*, 7(2), pp.126-31.
- Blobel, C.P., Myles, D.G., Primakoff, P. and White, J.W. 1990. Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *Journal of Cell Biology*, 111, pp.69-78.
- Bolarín, A., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Hernández, M., Vázquez, J.M. and Martínez, E.A., 2006. Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology*, 65(3), pp.669-80.
- Boletín Oficial del Estado (BOE), 15 de octubre del 2001. Real Decreto 1083/2001, de 5 de Octubre, Norma de calidad para el jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España.
- Boletín Oficial del Estado (BOE), 3 de marzo del 2006. ORDEN APA/661/2006 por la que se sustituye el Anexo del Real Decreto 1682/1997, de 7 de noviembre, por el que se actualiza el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248-54.

- Breining, E., Beorlegui, N.B., O'Flaherty, C.M. and y Beconti, M.T. 2005. Alpha-tocophenol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63, pp.2126-35.
- Briz, M., Bonet, S., Pinart, E., Egozcue, J. and Camps, R. 1995. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *Journal of Andrology*, 16, pp.175-88.
- Brokaw, C.J. 1987. Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 35, pp.175-84.
- Brouwers, J.F., Silva, P.F. and Gadella, B.M. 2005. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*. 63, pp.458-69.
- Buhr, M.M. 2001. Preservation of boar sperm alters membrana molecular dynamics. En: *Boar Semen Preservation II*, L.A. Johnson and D. Rath, (ed) Paul Parey Sci. Pub., New York.
- Buhr, M.M. and Pettitt, M.J. 1996. Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurement. En: *Johnson LA, Rath D, Weitze KF, (ed.) Boar Semen Preservation III*. Proceedings of the 3rd International Congress on Boar Semen Preservation, Mariensee. *Reproduction in Domestic Animals (Suppl)*. 1, pp.147-52.
- Buhr, M.M., Curtis, E.F. and Kakuda, N.S. 1994. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 31, pp.224-38.
- Buhr, M.M., Fiser, P., Bailey, J.L. and Curtis, E.F. 2001. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *Journal of Andrology*, 22, pp.961-69.
- Buhr, M.M., He, L. and Kasimanickam, V. 2000. Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. En: *Boar semen IV, pp 61-70. L.A. Johnson and H.D. Guthrie (ed.)*. Allen Press, Inc. Lawrence, K.S. USA.
- Buranaamnuay, K., Tummaruk, P., Singlor, J., Rodriguez-Martinez, H. and Techakumphu, M. 2009. Effects of straw volume and Equex-STM on boar sperm quality after cryopreservation. *Reproduction in Domestical Animals*, 44, pp.69-73.

- Bussi re, J.F., Bertaud, G. y Guilloeuet, P. 2000. Conservation de la semence congelée de verrat. Résultats in Vitro et après insémination. *Journées de Recherche Porcine en France*, 32, pp.429-32.
- Bussl re, J.F. Bertand, G. y Guillouet, P. 2000. Conservation de la semence congelée de verrat: résultats in Vitro et après insemination. *Journées de la Recherches Porcine en France*, 32, pp.424-32.
- Busto, O., Martí, M.P. y Guasch J. 2002. La nariz electrónica en el control de calidad de vinos. Nuevas aplicaciones. *Tecnología del vino: Tratamientos y equipos para viticultura y enología*, 5, pp.31-35.
- Caballero, I., Vázquez, J.M., Centurión, F., Rodríguez-Martínez, H., Parrilla, I., Cuello, C. and Martínez, E.A. 2004. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reproduction in Domestical Animals*, 39, pp.370-75.
- Caiza De La Cueva, H., Rigau, T., Rosa, P., Piedrahita, J. and Rodríguez-Gil, J.E. 1997. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal of Reproduction Science*, 48, pp.301-15.
- Calvete, J.J., Dostálová, Z., Sanz, L., Adermann, K., Thole, H.H. and Töpfer-Petersen, E. 1996. Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins. *FEBS Letters*, 379, pp.207-11.
- Calvete, J.J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L. and Töpfer-Petersen, E. 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Letters*, 407, pp.201-06.
- Canvin, A.T. and Buhr, M.M. 1989. Effect of temperatura on fluidity of boar sperm membranas. *Journal Reproduction and Fertility*, 85, pp.533-40.
- Carlson, A.E., Westenbroek, R.E., Quill, T., Ren, D., David, E.C., Hille, B., Garbers, D.L. and Babcock, D.F. 2003. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Cell Biology*, 100, pp.14864-68.
- Carpenter, J.F. and Crowe, J.H. 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 25, pp.244-55.
- Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz., M., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. and Roca, J. Effexts of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. 2004. *Journal of Andrology*, 25, pp.389-96.

- Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., and Bonet, S. 2010. Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Animal Reproduction Science*, 118, pp.69-76.
- Centurión, F., Vázquez, J.M., Calvete, J.J., Roca, J., Sanz, L., Parrilla, I., García, E. and Martínez, E.A. 2003. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction*, 69, pp.640-6.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizza, F. and Gliozzi, T.M. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 121, pp.395-401.
- Chatterjee, S. and Gagnon, C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 59, pp.451-58.
- Chen, Y.M., Foote, R.H. and Brockett, C.C. 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30, pp.423-31.
- Clemente, I., Membrillo, A., Azor, P., Dorado, G., Rodero, A. y Molina A. 2006. Algunas consideraciones sobre las diferentes clasificaciones del tronco porcino Ibérico: una propuesta integradora. *Solo Cerdo Ibérico*, 16, pp.7-18.
- Cooper, T.G. 1986. The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization. En: *Springer-Verlag (Berlin)*. Crim, L.W., Watts, E.G. and Evans, D.M. 1975.
- Cooper, T.G., Yeung, C.H., Meyer, R. and Schulze, H. 1990. Maintenance of human epididymal epithelial cell function in monolayer culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90, pp.81-91.
- Córdova, A., Pérez-Gutiérrez, J.F., Lleo, B., García-Artiga, C., Álvarez, A., Drobchak, V. and Martín-Rillo, S. 2002. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 mL straws. *Theriogenology*, 57, pp.2119-28.
- Correa, E.C. 2003. *Desarrollo de una aplicación a la detección de aromas para una nariz electrónica del tipo Microbalanzas de Cristal de Cuarzo (QCM) para su adaptación a la determinación de calidad en frutas*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Crabo, B.G. and Einarsson, S. 1971. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Veterinarian Scandinave*, 12, pp.125-127.

- Cremades, T., Carvajal, G., Hernández, M., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. and Roca, J. 2004. The addition of seminal plasma from individual boars to freezing extender can improve the post-thaw sperm survival. *Reproduction Fertility and Development*, 69, pp.167.
- Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. 2005. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, 26, pp.610-8.
- Dacheaux, J.L., Gatti, J.L. and Dacheux, F.. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique*, 61, pp.7-17.
- Darin-Bennett, A. and White, I.G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14, pp.466-70.
- Darszon, A., López-Martínez, P., Acevedo, J.J., Hernández-Cruz, A. and Treviño, C.L. 2006. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium*, 40, pp.241-52.
- Daza, A., Mateos, A., Rey, A.I., Ovejero, I., and López-Bote, C.J. 2007. Effects of duration of feeding under free-range conditions on production results and carcass and fat quality in Iberian pigs. *Meat Science*, 76, pp.411-16.
- De Leeuw, F.E., Chen, H.C., Colenbrander, B. and Verkleij, A.J. 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27, pp.171-83.
- De Leeuw, F.E., Colenbrander, B. and Verkleij, A.J. 1991. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*, 1, pp.95-104.
- De Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H., Colenbrander, B. and Verkleij, A.J. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30, pp.32-44.
- De Mercado, E., Hernández, M., Sanz, E., Rodríguez, A., Gómez, E., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. and Roca, J. 2009. Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal of Reproduction Science*, 115, pp.149-57.
- Delgado, J.V. y Olliver, L. 2000. Conservación de los recursos genéticos porcinos en Europa. *Porci*, 60, pp.17-27.

- Diéguez, E. 1999. La raza porcina ibérica: sus estirpes y selección. En: *I Jornadas sobre El Cerdo Ibérico y sus Productos*. Salamanca-Guijuelo 22-25 de junio de 1999. España.
- Dostalova, Z., Calvete, J.J., Sanz, L. and Topfer-Petersen, E. 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1200, pp.48-54.
- Dott, H.M., Harrison, R.A. and Foster, G.C. 1979. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, 55, pp.113-24.
- Drobnis, E.Z., Crowe, L.M., Berger, T., Anchordoguy, T.J., Overstreet, J.W. and Crowe, J.H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265, pp.432-37.
- Ekhlesi-Hundrieser, M., Sinowatz, F., Greiser De Wilke, I., Waberski, D. and Töpfer-Petersen, E. 2002. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Molecular Reproduction and Development*, 61, pp.32-41.
- Ekwall, H., Eriksson, B., Courtens, J.L. and Rodríguez-Martínez, H. 1996. Assessment of ice content and morphological alterations in boar spermatozoa frozen in maxi-straws. En: *Proc. of the 13th ICAR*, Sydney. 2, pp.2-5.
- Eng, L.A. and Oliphant, G. 1978. Rabbit sperm reversible decapacitation by membran stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 19, pp.1083-94.
- Eriksson, B.M. and Rodríguez-Martínez, H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Animal of Reproduction Science*, 63(3-4), pp.205-20.
- Eriksson, B.M., Petersson, H. and Rodríguez-Martínez, H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*, 58, pp.1065-79.
- Eriksson, B.M., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Roca, J., Lucas, X. and Rodríguez-Martínez, H., 2001. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, 55, pp.1593-1605.

- Espí, A., Prieto, J.M. and Alzaga, V. 2008. Leptospiral antibodies in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), fallow deer (*Dama dama*) and European wild boar (*Sus scrofa*) in Asturias, Northern Spain. *Veterinary journal*, 183(2), pp.226-7.
- Fernández, A.I., Alves, E., Fernández, A., de Pedro, E., López-García, M.A., Ovilo, C., Rodríguez, M.C. and Silio, L. 2008. Mitochondrial genome polymorphisms associated with longissimus muscle composition in Iberian pigs. *Journal of Animal Science*, 86, pp.1283-90.
- Fernández-Juan, M., Gallego, M., Barrios, B., Osada, J., Cebrián-Pérez, J.A. and Muíño-Blanco, T. 2006. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. *Journal of Andrology*, 27(4), pp.588-95.
- Fiser, P.S. 1991. Interactions of cooling velocity, warming velocity and glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar sperm. En: *Boar Semen Preservation II*. (ed.) Johnson, L.A., Rath, D. Reproduction in Domestic Animals,. Proceedings of the 2nd International Conference on Boar Semen Preservation. Berlin and Hamburg: Paul Parey Scientific. Pp.123-37.
- Fiser, P.S. and Fairfull, R.W. 1990. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 mL straws, *Molecular Reproduction and Development*, 25, pp.123-129.
- Flowers, W.L. and Turner, Z.A. 2001. Relationships between seminal plasma protein profiles and estimates of fertility for boars. En: *VIth International Conference on Pig Reproduction*. Greenville, NC: University of Missouri. Pp.65.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Satnley, G.H. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biology Chemistry*, 226, pp.497-509
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1998. *Secondary Guidelines for the Management of Small Populations at Risk*. FAO Publications, Rome.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1993. *World Watch List for Domestic Animal Diversity*. R. Loftus y B. Scherf (eds.). Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/United Nations Environment Program (UNEP) FAO/UNEP. 1995. *World Watch List for Domestic Animal Diversity*. 1ª ed. Ed. B. Scherf. FAO. Roma, 369.

- Fraser, L. y Strzezek, J. 2007. Effects of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Animal of Reproduction Science*, 99, pp.317-29.
- Fraser, L.R., Harrison, R.A. and Herod, J.E. 1990. Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89, pp.135-48.
- Fraser, L.R., Harrison, R.A. and Herod, J.E. 1990. Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 89, pp.135-148.
- Gadea, J., Gumbao, D., Matas, C. and Romar, R. 2005. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology*, 26, pp.749–56.
- Gadea, J., Selles, E., Marco, M.A., Coy, P., Matas, C., Romar, R. and Ruiz, S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 62, pp.690-701.
- Gadella, B.M. and Harrison, R.A. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. *Development*, 127, pp.2407-20.
- Gadella, B.M. and Van Gestel, R.A. 2004. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Animal of Reproduction Science*, 82-83, pp.307-29.
- Gadella, B.M., Miller, N.G.A., Colenbrander, B., van Golde, L.M.G. y Harrison, R.A.P. 1999. Fluor cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Molecular Reproduction and Development*, 53, pp.108-25.
- Galantino-Homer, H.L., Zeng, W.X., Megee, S.O., Dallmeyer, M., Voelkl, D. and Dobrinski, I. 2006. Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Molecular Reproduction and Development*, 73, pp.638-50.
- Gandini, G.C. and Oldenbroek, J.K. 1999. *Choosing the conservation strategy. Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources*. Chapter 2. (ed.) JK Oldenbroek, 11-30.

- Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P. and Critser, J.K. 1993. Hypemsmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, 49, pp.112-23.
- Gao, D.Y., Mazur, P. and Critser, J.K. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. En: *A.M. Karow, J.K Critser, San Diego, CA, pp.263–328.*
- Garcia, E.M., Vázquez, J.M., Calvete, J.J., Sanz, L., Caballero, I., Parrilla, I., Gil, M.A., Roca, J. and Martínez, E.A. 2006. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *Journal of Andrology*, 27, 434-43.
- Garner, D.L. and Hafez, E.S.E. 1993. Spermatozoa and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals, 6th edition. Hafez ESE (ed). Lea and Febiger.* (Philadelphia. USA). pp. 165-187.
- Garner, D.L. and Johnson, L.A. 1995. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction*, 53, pp.276-84.
- Garner, D.L., Thomas, C.A., Gravance, C.G., Marshall, C.E., DeJarnette, J.M. and Allen, C.H. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, 56, pp.31-40.
- Gatti, J.L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V. and Dacheux, J.L. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal of Reproduction Science*, 82, pp.321-39.
- Gatti, J.L., Druart, X., Guerin, Y., Dacheux, F. and Dacheux, J.L. 1999. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biology of Reproduction*, 60, pp.937-45.
- Geisert, R.D. 1999. Pigs. En: *Encyclopedia of Reproduction. Knobil, E., Neill, J.D. (ed.)* Academic Press (San Diego, USA). pp. 792-799.
- Gil, M.A., Roca, J., Cremades, T., Hernández, M., Vázquez, J.M., Rodríguez-Martínez, H. and Martínez, E.A. 2005. Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?. *Theriogenology*, 64, pp.305-16.
- Gil, M.C., García-Herreros, M., Barón, F.J., Aparicio, I.M., Santos, A.J. and García-Marín, L.J. 2009. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional

- significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, 71, pp.254-63.
- Gilmore, J.A., Junying, Du., Jun, Tao., Peter, A.T. and Critser, J.K. 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107, pp.87-95.
- Gilmore, J.A., Liu, J., Peter, A.T. and Critser, J.K. 1998. Determination of Plasma Membrane Characteristics of Boar Spermatozoa and Their Relevance to Cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 58, pp.28-36
- González-Bulnes, A., González-Añover, P., Torres-Rovira, L., Encinas, T., Sánchez-Sánchez, R., Gómez-Izquierdo, E., Pallarés, P., de Mercado, E. and Gómez, J. 2010. Reproducción: Factores determinantes de la eficiencia reproductiva en la cerda Ibérica. En: *VII Jornadas sobre el Cerdo Ibérico y sus Productos*. Salamanca 28-29 de Octubre de 2010.
- Graham, E.F. and Crabo, B.G. 1972. Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa. En: *Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Vol 2. Munich: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 1627-1632.
- Graham, E.F., Rajamannan, A.H., Schmehl, Jr. M.K.L., Maki-Laurila, M. y Bower, R.E., 1971a. Preliminary reports on procedure and rationale for freezing boar semen. *A.I. Digest*. 19, 12-14.
- Graham, E.F., Rajamannan, A.H.J., Schmehl, M.K.L., Maki-Laurila, M. and Bower, R.E. 1971b. Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *AI Digest*, 19, pp.16-18.
- Graham, J.K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, 41, pp.1151-62.
- Green, C. E. y Watson, P. F. 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122, pp.889–98.
- Harayama, H. and Kato, S. 1992. Changes in motility and morphology of spermatozoa during their transit through the epididymis in Meishan boars at various ages. *Animal Science and Technology (Japan)*, 3, pp.462-7.
- Harshan, H.M., Singh, L.P., Arangasamy, A., Ansari, M.R. and Kumar, S. 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in

- vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal. of Reproduction Science*, 93, pp.124-33.
- He, L., Bailey, J.L. and Buhr, M.M. 2001. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potencial. *Biology of Reproduction*, 64, pp.69-79.
- Helenius, A. and Simons, K. 1975. Solubilisation of membrane by detergents. *Biochimical et Biophysical Acta*, 415, pp.29-34.
- Henault, M.A. and Killian, G.J. 1996. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108, pp.199-204.
- Hernández, M. 2007. *Criopreservación Espermática en la Especie Porcina: Variabilidad Individual*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Hernández, M., Roca, J., Ballester, J., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Johannisson, A., Saravia, F. and Rodriguez-Martinez, H. 2006. Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *International journal of Andrology*, 29, pp.583-91.
- Hernández, M., Roca, J., Calvete, J.J., Sanz, L., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. 2007. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *Journal of Andrology*, 28, pp.689-97.
- Hess, R.A. 1999. Spermatogenesis, Revisión. En: *Encyclopedia of Reproduction*. (ed) E. Knobil and J.D. Neill. Academic Press, San Diego, USA. 4, 539-545.
- Hiemstra, S.J. 2004. Guidelines for the Constitution of National Cryopreservation Programmes for Farm Animals. En: *European regional focal point for animal genetic resources, Centre for Genetic Resources*. The Netherlands (CGN) of Wageningen University and Research Center, P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad, The Netherlands.
- Hofmo, P.O. and Amlid, T. 1991. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. En: *Johnson LA. Rath D. eds. Boar Semen Preservation II*. Proceedings of the 2nd International Congress on Boar Semen Preservation. Beltsville. Reproduction in Domestic Animals (Suppl) 1, pp. 111-22.

- Holt, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, pp.47-58.
- Holt, W.V., Medrano, A., Thurston, L.M. and Watson, P.F. 2005. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 63, pp.370-82
- Infometrix, Inc. 2003. Pirouette, Version 3.11, Multivariate data analysis, U.S.A., 176.
- Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. 1978. Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, pp.379-83.
- Jansen, S., Ekhlasi-Hundrieser, M. and Töpfer-Petersen, E. 2001. Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs*, 168, pp.88-92.
- Jelinkova, P., Liberda, J., Manaskova, P., Ryslava, H., Jonakova, V. and Ticha, M. 2004. Mannan-binding proteins from boar seminal plasma. *Journal of Reproductive Immunology*, 62, pp.167-82.
- Jobim, M.I., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F. and Mattos, R.C. 2004. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 61, pp.255-66.
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P. and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of boar semen. *Animal of Reproduction Science*, 62, pp.143-172.
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P. and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of boar semen. *Animal of Reproduction Science*, 62, pp.143-72.
- Jonáková, V., Manásková, P., Kraus, M., Liberda, J. and Ticha, M. 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 56, pp.275-77.
- Joyal, S.M., Kennedy, B.W. and Wilkins, J.N. 1986. Boar, breed and environmental effects on motility of frozen-thawed spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science*, 66, pp.663-68.
- Kaneto, M., Harayama, H., Miyake, M. and Kato, S. 2002. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Animal of Reproduction Science*, 73, pp.197-209.

- Kato, S., Shibukawa, T., Harayma, H. and Kankan, Y. 1996. Timing of Shedding and Disintegration of Cytoplasmic Droplets from Boar and Goat Spermatozoa. *Journal Reproduction and Development*, 23, pp.237-41.
- Kawano, N., Shimada, M. and Terada, T. 2004. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*, 61, pp.351-64.
- Khelifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J.F., Chatagnon, G., Trimeche, A. and Tainturier, D. 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*, 63(1), pp.138-49.
- Killian, G.J., Chapman, D.A. and Rogowsli, L.A. 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 49, pp.1202-7.
- Krueger, C. and Rath, D. 2000. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reproduction Fertility and Development*, 12, pp.113-17.
- Kumar, G.P., Laloraya, M. and Laloraya, M.M. 1991. Superoxide radical level and superoxide dismutase activity changes in maturing mammalian spermatozoa. *Andrology*, 23, pp.171-75.
- Labroue, F., Luquet, M., Guillouet, P., Bussiere, J.F., Glodek, P. and Wemheuer, W. 2000. La cryoconservation des races porcines menaces de disparition. La situación en france, en Allemagne, en Italia, et en Espagne. En: *32èmes Journées de la Recherche Porcine en France*, 32, pp.419-27.
- Laguerre, M., Mestres, C., Davrieux, F., Ringuet, J. and Boulanger, R. 2007. Rapid Discrimination of Scented Rice by Solid-Phase Microextraction, Mass Spectrometry, and Multivariate Analysis Used as a Mass Sensor. *Jorunal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp.1077-83.
- Lalonde, R.J.; Lepock, J.R. y Kruuv, J. 1991. Site of freeze-thaw damage and cryoprotection by amino acids of calcium ATPase sacroplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysca Acta*, 1079, pp.128-38.
- Landaud, S., Helinck, S. and Bonnarme, P. 2008. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, pp.1191-205.
- Larsson, K. and Einarsson, S. 1976. Fertility of deep frozen boar spermatozoa: influence of thawing diluents and of boars. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 17, pp.43-62.

- Larsson, K., S. Einarsson, S. and Bane. A. 1976. The fertility of boar semen frozen by two different methods. En: *Proc. VIII International Congress Animal Reproduction & A.I. Cracow. 4, pp.1024-1026.*
- Lavon, V. and Bournsell, J.C. 1971. Characterization of boar seminal plasma, vesicular secretion and epididymal plasma proteins by gel disc electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27, pp.227-32.
- Li, Y., Si, W., Zhang, X., Dinnyes, A. and Ji, W. 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *American Journal of Primatology*, 59, pp.159-65.
- Liberda, J., Manaskova, P., Prelovska, L., Ticha, M. and Jonakova, V. 2006. Saccharidemediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *Journal of Reproductive Immunology*, 71, pp.112-25.
- Liu, Y., Du, Y., Lin, L., Li, J., Kragh, P.M., Kuwayama, M., Bolund, L., Yang, H. and Vajta, G. 2008. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. *CryoLetters*, 29, pp.315-20.
- Lund, P. and Holmer, G. 2001 Characterization of volatiles from cultured dairy spreads during storage by dynamic headspace GC/MS. *European Food Research and Technology*, 212, pp.636-42.
- Madjian, A., Pizza, F., Gliozzi, T. Cerolini, S., Penny, P. and Noble, R. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, 63, pp.411-21.
- Maeda, T., Nishida, J. and Nakanishi, Y. 1999. Expression pattern, subcellular localization and structure-function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. *Development, Growth & Differentiation*, 41, pp.715-22.
- Manjunath, P. and Therien, I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal or Reproductive Immunology*, 53, pp.109-19.
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. 1981. Male Reproductive Function and Semen. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology. En: *Springer-Verlag, Berlin*, pp.495.

- Marigorta, P., García, P., Díaz, C., Sánchez, R. and Saiz, F. 2002. Niveles de proteína hidroprecipitables en el plasma seminal del cerdo Ibérico. En: *V Congreso de la Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales*. III Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. SERGA & SPREGA. Madrid.
- Marsili, R. T. 1999. SPME-MS-MVA as an electronic nose for the study of off-flavors in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp.648-54.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G. and Asensio, M.A. 2006. Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 110, pp.8-18.
- Martín, C., Lizaso, J., Mallo, J.J., Carrasco, J.A., Gimenez, L., Gómez, E., Rodríguez, A., de Mercado, E. y Sanz, E. 2009. Diferenciación en la calidad del cerdo Ibérico de cebo. *Tierras de Castilla y León*, 154, pp.94-8.
- Martín, C., Lizaso, J., Mallo, J.J., Carrasco, J.A., Lopez, C., Gómez, E., Rodríguez, A., de Mercado, E. y Sanz, E. 2007. Estudio de distintos programas de alimentación en cerdo Ibérico. Influencia en los rendimientos zootécnicos, perfil de ácidos grasos y calidad de los productos elaborados. *Tierras de Castilla y León*, 132, pp.73-8.
- Martin, J.C., Klug, E. and Gunzel, A.R., 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27, pp.47-51.
- Martín, S. 1982. *Reproducción e inseminación artificial porcina*. Biblioteca Agrícola Aedos. Editorial Aedos.
- Martínez, E.A., Vázquez, J.M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M.A., Parrilla, I., Vázquez, J.L. and Day, B.N. 2002. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*, 123, pp.163-70.
- Maxwell, W.M. and Stojanov, T. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction Fertility and Development*, 8, pp.1013-20.
- Maxwell, W.M., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillan, L., Gellatly, E.S. and McPhie, C.A. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development*, 11, pp.123-6.

- Maxwell, W.M.C, and Johnson, L.A. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52, pp.1353-62.
- Maxwell, W.M.C. and Johnson, L.A. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48, pp.209-19.
- Maxwell, W.M.C., de Graaf, S.P., El-Hajj Ghaoui, R. and Evans, G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and fertility. En: *Juengel II, Murria JF and Smith MF* (ed). *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham UK: Nottingham University Press; pp.13-38.
- Maxwell, W.M.C., Welch, G.R. and Johnson, L.A. 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development*, 8, pp.1165-78.
- Mazur, P. 1965. Causes of injury in frozen and thawed cells. *Federation Proceedings*, 24, pp.175-82.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal Physiology*. 247, pp.125-42.
- Mazur, P., Leibo, S.P. and Chu, E.H. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, 71, pp.345-55.
- Miller, R.R.Jr., Cornett, C.L., Waterhouse, K.E. and Farstad, W. 2005. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. *Cryobiology*, 51, pp.66-75.
- Miller, R.R.Jr., Sheffer, C.J., Cornett, C.L., McClean, R., MacCallum, C. and Johnston, S.D. 2004. Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. *Cryobiology*, 49, pp.137-48.
- Millette, C.F. 1999. Spermatozoa. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and J.D. Neill. Academic Press, San Diego, USA, 1999; Vol 4: pp.586-96.
- Mocé, E. and Graham, J.K. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, 84, pp.826-33.

- Molinia, F.C., Evans, G. and Maxwell, W.M. 1994. Effect of polyols on the post-thawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa. *Theriogenology*, 42, pp.15-23.
- Moore, A. I., Squires, E. L. and Graham, J. K. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51, pp.241-49.
- Morris, G.J. 2006. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction*, 21, pp.2075-83.
- Morris, L.H.A., Hunter, R.H.F. and Alen, W.R. 2000. Hysteroscopic of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, pp.95-100.
- Mortimer, S.T., Swan, M.A. and Mortimer, D. 1998. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13, pp.2139-46.
- Muller, K., Pomorski, T., Muller, P., Zachowski, A. and Hermann, A. 1994. Protein dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry*. 33, pp.9968-74.
- Nagai, T., Niwa, K. and Irritan, A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70, pp.271-5.
- Narvaez-Rivas, M., Vicario, I.M., Constante, E.G. and León-Camacho, M. 2007. Changes in the concentrations of free fatty acid, monoacylglycerol, and diacylglycerol in the subcutaneous fat of Iberian ham during the dry-curing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp.10953-61.
- Nauc, V. and Manjunath, P. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction*, 63, pp.1058-66.
- Nieto, R., Miranda, A., García, M.A. and Aguilera, J.F. 2002. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *British Journal of Nutrition*, 88, pp.39-49.
- Niñoles, L., Clemente, G., Ventanas, S., and Benedito, J. 2007. Quality assessment of Iberian pigs through backfat ultrasound characterization and fatty acids composition. *Meat Science*, 76, pp.102-11.

- Nolan, J.P., Magargee, S.F., Posner, R.G. and Hammerstedt, R. 1995. Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry*, 33, pp.9968-74.
- Oko, R.O. and Clermont, Y. 1999. Spermiogenesis. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and J.D. Neill. Academic Press, San Diego, USA. 4, pp.602-09.
- Okunade, G.W., Miller, M.L., Pyne, G.J., Sutliff, R.L., O'Connor, K.T., Neumann, J.C., Andringa, A., Millar, D.A., Prasad, V., Doetschman, T., Paul, R.J. and Shull, G.E. 2004. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, pp.33742-50.
- Oldenbroek, J.K. 1998. *Genebanks and the conservation of the farm animal genetic resources*. ID-DLO, Lelystad. The Netherlands, pp.119.
- Olsson, J., Böerjesson, T., Lundstedt T. and Schnürer, J. 2000. Volatiles for mycological quality grading of barley grains: determinations using gas chromatography-mass spectrometry and electronic nose. *International Journal of Food Microbiology*, 59, pp.167-78.
- Ortman, K. and Rodriguez-Martinez, H. 1994. Membrana damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar packaged in plastic bags. *Zentralbl Veterinarmed*, 41, pp.37-47.
- Óvilo, C. 1999. *Marcadores moleculares y caracteres productivos en porcino*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Parks, J.E. and Hammerstedt, R.H. 1985. Developmental changes occurring in the lipid of ram epididymal sperm plasma membranes. *Biology of Reproduction*, 32, pp.653-68.
- Parks, J.E. and Lynch, D.V. 1992. Lipid composition and the thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29, pp.255-66.
- Parks, J.E., Arion, J.W. and Foote, R.H. 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 37, pp.1249-58.
- Patterson R.L. and Mottram D.S. 1974. The occurrence of volatile amines in uncured and cured pork meat and their possible role in nitrosamine formation in bacon. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 25, pp.1419-25.

- Paulenz, H., Taugbol, O., Hofmo, P.O. and Saarem, K. 1995. A preliminary study on the effect of dietary supplementation with cod liver oil on the polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. *Veterinary Research Communications*, 19, pp.273-84.
- Peinado, B., Poto, A., Gadea, J. y Ruíz, S. 1998. Estudios preliminares en la crioconservación de espermatozoides porcinos de la raza chato murciano. *Archivos de Zootecnia*, 47, pp.305-10.
- Peña, A. and Linde-Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54, pp.859-75.
- Peña, A.I., Lugilde, L.L., Barrio, M., Herradon, P.G. and Quintela, L.A. 2003. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog sperm. *Theriogenology* 59, pp.1725–39.
- Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-Martínez, I., Tapia J.A., Johannisson, A., Wallgren, M. and Rodríguez-Martínez, H. 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology*, 26, pp.716-23
- Penfold, L.M. and Moore, H.D. 1993. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99, pp.131-4.
- Peres, C., Denoyer, C., Tournayre, P. and Berdague, J.L. 2002. Fast characterization of cheese by dynamic headspace-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74, pp.1386-92.
- Peres, C., Viallon, C. and Berdague, J.L. 2001. Solid-phase microextraction spectrometry: A new approach to the rapid characterization of cheeses. *Analytical Chemistry*, 73, pp.1030-6.
- Pérez, C., Martín-Rillo, S., Saíz, F., Martínez, E., Sebastián, J.J. y Sánchez, R. 1988. Resultados del comportamiento de verracos Ibéricos habituados a la monta natural en el entrenamiento para inseminación artificial. *Medicina Veterinaria*, 5, pp.299-304.
- Peris, M. and Escuder-Gilabert, L. 2009. A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Analytica Chimica Acta*, 638, pp.1-15.

- Pettit, M.J. and Buhr, M.M. 1998. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 19, pp.736-46.
- Piehl, L., Cisale, H., Torres, N., Capani, F., Sterin-Speziale, N. and Hager, A. 2006. Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, 92, pp.401-10.
- Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Pastor, L.M., Sancho, S., Garcia, N., Badia, E. and Bassols, J. 2001. Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid *Sus domesticus* males. *International Journal of Andrology*, 24, pp.153-64.
- Pinart, E., Sancho, S., Briz, M., Bonet, S., Garcia, N. and Badia, E. 2000. Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism. *Journal of Morphology*, 244, pp.190-202.
- Plummer, J.M. and Watson, P.F. 1985. Ultrastructural localization of calcium ions in ram spermatozoa before and after cold shock as demonstrated by pyroantimonate technique. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75, pp.255-63.
- Polge, C. 1958. Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 147, pp.498-508.
- Polge, C., Salamon, S. and Wilmut, I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Veterinary Record*, 87, pp.424-28.
- Pollard, J.W. and Leibo, S.P. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41, pp.101-06.
- Pontbriand, D., Howard, J.G., Schiewe, M.C., Stuart, L.D. and Wildt, D.E., 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26, pp.341-54.
- Poto, A., Peinado, B., Barba, C. y Delgado, J.V. 2000. Congelación de semen de porcino de razas autóctonas en peligro de extinción. Influencia de la metodología en bancos de germoplasma para pequeñas poblaciones. *Archivos de Zootecnia*, 49, pp.493-6.
- Poulos, A., Darin-Bennett, A. and White, I.G. 1973. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 46, pp.541-9.

- Praisler, M., Dirinck, I., Van Bocxlaer, J., De Leenheer, A. and Massart, D.L. 2000. Pattern recognition techniques screening for drugs of abuse with gas chromatography–Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta*, 53, pp.177-93.
- Purdy, P.H. and Graham, J.K. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 48, pp.36-45.
- Pursel V.G., Johnson, L.A. and Rampacek G.B. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, 34, pp.278-83.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L. 1973a. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15° C. *Journal of Animal Science*, 37(2), pp.532-5.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L. 1973b. Effect of dilution, seminal plasma, and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 37, pp.528–31.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L., 1972. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 35, pp.580-4.
- Pursel, V.G., Schulman, L.L. and Johnson, L.A. 1978a. Effect of Orvus es Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozenthawed boar sperm. *Journal of Animal Science*, 47, pp.198-202.
- Pursel, V.G., Schulman, L.L. and Johnson, L.A. 1978b. Effect of glycerol concentration on frozen boar sperm. *Theriogenology*, 9, pp.305-12.
- Pursel, V.G., and Johnson, L.A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*, 40, pp.99-102.
- Quinn, P.J. 1989. Principles of membrane stability and phase behaviour Under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21, pp.3-19.
- Quintero, A. 2003. *Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Radovic, B.S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M. and Anklam, E. 2001. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72, pp.511-20.
- Ramírez, M.R., y Cava, R. 2007. Effect of IberianxDuroc genotype on drycured loin quality. *Meat Science*, 76, pp.333-41.

- Rath, D. and Niemann, H. 1997. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozenthawed ejaculated or frozen thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*, 47, pp.785–93.
- Reed, H.C.B. 1985. *Current use of frozen boar semen-future need of frozen boar semen*. In: Deep freezing of boar semen, Johnson LA and Larsson K (Eds), 1985, pp 225-238.
- Renard, P., Le Lannou, D., Trimeche, A., Griveau, J.F and Le Lannou, D. 1996. Improvement of motility and fertilization potencial of post-thaw Human sperm using amino acids. *Cryobiology*, 33, pp.311-19.
- Robic, A., Larzul, C. and Bonneau, M. 2008. Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue: A review. *Genetics Selection Evolution*, 40, pp.129-43.
- Robl, J.M. and Fissore, R.A. 1999. Gametes, Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, 1999; 2, pp.430-34.
- Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X.M., Vazquez, J.M. and Martinez. E.A. 2002. Fertility of cryopreserved boar spermatozoa after transcervical deep intrauterine insemination. *Theriogenology*, 57, pp.385.
- Roca, J., Gil, M.A., Hernández, M., Parrilla, I., Vazquez, J.M. and Martinez, A. 2004. Survival and fertility boar spermatozoa alter freeze-thawing in extender supplemented with Butylated Hydroxytoluene. *Journal of Andrology*, 25, pp.397-405.
- Roca, J., Hernández, M., Carvajal, G., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, 84, pp.2692-99.
- Roca, J., Rodríguez, M.J., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia. E.M., Cuello, C., Vazquez J.M. and Martinez, A. 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in presence of Superoxide Dismutasa and/or Catalase. *Journal of Andrology*, 26, pp.15-23.
- Rodríguez-Bencomo, J.J, Ortega-Heras, M., Pérez-Margariño, S. and González-Huerta, C. 2009. Volatile compounds of red wines macerated with Spanish, American, and French oak chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp.6383-91.
- Romero, A., Romão, M.J., Varela, P.F., Kölln, I., Dias, J.M., Carvalho, A.L., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. and Calvete, J.J. 1997. The crystal structures of two

- spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4, pp.783-788.
- Roncoletta, M., Morani, E.S.C., Franceschini, P.H. y Ramos, P.R.R. 2000. Caracterização da proteína 26-kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. *Arq Fac Vet UFRGS*, 28, pp.323.
- Rota, A.B., Strom, C., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H., 1997. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 °C. *Theriogenology*, 47, pp.1093-101.
- Ruiz, J., Cay, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J. and Lopez-Bote, C. 1998. Prediction of the feeding background of Iberian Pig using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Science*, 49, pp.155-63.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. and García, C. 1999. Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52, pp.19-27.
- Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T. and Tanabe, T. 2002. Ca(v)2.3 (alpha1E) Ca²⁺ channel participates in the control of sperm function. *FEBS Letters*, 516, pp.229-33.
- Salamon, S. 1968. Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Australian Journal of Biological Sciences*, 21, pp.351-60.
- Sánchez, R., García, P., Sebastián, J.J., Pérez, C., Alias, E. and Martín-Rillo, S. 1987. Resultados de fertilidad en inseminación por vía quirúrgica con semen congelado con poca capacidad fecundante. En: *III Jornadas Internacionales sobre Reproducción e Inseminación Artificial*. Pp.201-4.
- Sancho, S., Casas, I., Ekwall, H., Saravia, F., Rodriguez-Martinez, H., Rodriguez-Gil, J.E., Flores, E., Pinart, E., Briz, M., Garcia-Gil, N., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M. and Bonet, S. 2007. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction*, 134, pp.111-21.
- Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Schafer, W., Schmid, E.R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Ehrhard, M. and Topfer-Petersen, E. 1992. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Letters*, 300, pp.213-8.

- Schroter, S., Osterhoff, C., McArdle, W. and Ivell, R. 1999. The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction*, 5, pp.302-13.
- Seidel, G.E., Allen, C.H., Johnson, L.A., Holland, M.D., Brink, Z., Welch, G.R. Graham, J.K. and Cattell, M.B. 1997. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 48, pp.1255-64.
- Sellés, E., Gadea, J., Romar, R., Matás C. and Ruiz, S. 2003. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility, *Reproduction in Domestic Animals*, 38, pp.66-72.
- Sereno, J.R.B., Cabello, A., Sereno, F.T.P.S., Barba, C. y Delgado, J.V. 2003. Protocolo de congelación espermática propuesto para el cerdo ibérico. *Porci*, 73, pp.53-60.
- Setchell, B.P., Maddocks, S. and Brooks, D.E. 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (ed.) Raven Press (New York, USA). pp.1063-75.
- Singh, L.P., Harshan, H.M. and Ansari, M.R. 2007. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Animal of Reproduction Science*, 99, pp.395-400.
- Soede, N.M., Steverink, D.W.B., Langendijk, P. and Kemp, B. 2000. Optimized insemination strategies in swine AI. En: *Boar Semen Preservation IV* (ed.) L.A. Johnson and H.D. Guthrie. Allen press, Inc, Lawrence, KS, USA. pp.185-92.
- Strzezek, J. 2002. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Biology of Reproduction*, 2, pp.243-66.
- Strzezek, J., Glogowski, J., Margierska, E., Lubarda, Z. and Jablonowska, C.Z., 1984. Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. En: *Proceedings of the Tenth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, vol. 2. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Urbana-Champaign, IL, pp. 244-6.
- Strzezek, J., Hopfer, E. and Zaborniak, A. 1987. Zinc-ion dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Animal Reproduction Science*, 13 pp.133-142.
- Strzezek, J., Wysocki, P., Kordan, W., Kuklinska, M., Mogielnicka, M., Soliwoda, D. and Fraser, L. 2005. Proteomics of boar seminal plasma-current studies and

- possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Biology of Reproduction*, 5, pp.279-90.
- Sun, G.H., Liu, H.W., Lin, Y.C., Yu, D.S. and Chang, S.Y. 2000. Identification of maturation-related wheatgerm lectin-binding proteins in the culture of human corpus epididymal epithelial cells. *Archives of Andrology*, 45, pp.53-60.
- Suzuki, F. 1990. Morphological aspects of sperm maturation. En: *Fertilization in Mammals*. Bavister BD, Cummins J, Roldán E.R.S. Ed. Norwell (Massachusetts, USA). pp.65-75.
- Swain, S.E. and Millar, R.R.Jr. 2000. A postcryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. *Zoo Biology*, 19, pp.461-73.
- Sztejn, J.M., Noble, K., Farley, J.S. and Mobraaten, L.E. 2001. Comparison of permeating and non-permeating cryoprotectants for Mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 42, pp.28-39.
- Therien, I., Bergeron, A., Bousquet, D. and Manjunath, P. 2005. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, 71, pp.97-106.
- Therien, I., Bleau, G. and Manjunath, P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction*, 52, pp.1372-9.
- Therien, I., Soubeyrand, S. and Manjunath, P. 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biology of Reproduction*, 57, pp.1080-8.
- Thilmant, P. 2001. Congélation du sperme de verrat en paillettes fines de 0,25 mL. Resultats observes sur le terrain. *Journées de la Recherches Porcine en France*, 33, pp.151-156.
- Thilmant, P., 1997. Congélation du sperme de verrant en paillette de 0,5 mL. Résultats sur le terrain. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 141, pp.457-62.
- Thurston, L. M., Watson, P.F., Mileham, A.J. and Holt, W.V. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculate correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology*. 22, pp.382-94.

- Thurston, L.M., Holt, W.V. and Watson, P.F. 2003. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*, 60, pp.101-13.
- Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F. and Holt, W.V. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 66, pp545-54.
- Thurston, L.M., Watson, P.F. and Holt, W.V. 1999. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, pp.271-80.
- Thurston, L.M., Watson, P.F. and Holt, W.V. 1999. Sources of variation in boar spermatozoa fertility following cryopreservation. *Cryobiology*, 39, pp.335.
- Tienthai, P., Kjellen, L., Pertoft, H., Suzuki, K. and Rodriguez-Martinez H. 2000. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reproduction Fertility and Development*, 12, pp.173-82.
- Tomás, C., Blanch, E. and Mocé, E. 2008. Colesterol addition alter centrifugation improves goat sperm quality after cryopreservation. En: *1st International Meeting AERA-BAS. Reproduction in Domestical Animals*, 43. pp.53.
- Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., Dostálová, Z.Z., Reinert, M., Waberski, D., Sanz, L. and Hübner, T. 1995. One year in the life of the spermadhesin family. *Fertilität*, 11, pp.233-41.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Kirchhoff, C., Leeb, T. and Sieme, H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal of Reproduction Science*, 89, pp.159-70.
- Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P.F., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostálová, Z., Sanz, L. and Calvete, J.J. 1998. Spermadhesins: a new protein family: facts, hypotheses and perspectivas. *Andrologia*, 30, pp.217-24.
- Torretta, M. E., Wevar, V. C. y Forchetti. O. 1996. Calidad espermática in vitro, del semen congelado en macropajuelas, micropajuelas y pastillas. *Avances en Producción Animal*, 21, pp.185-189.

- Trimeche, A., Renard, P., Le Lannou, D., Barrière, P. and Tainturier, D. 1996. Improvement of motility of post-thaw Poitou Jackass sperm using glutamine. *Theriogenology*, 45, pp.1015-27.
- Udby, L., Bjartell, A., Malm, J., Egesten, A., Lundwall, A., Cowland, J., Borregard, N. and Kjeldsen, L. 2005. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *Journal of Andrology*, 26, pp.333-42.
- Vadnais, M.L. and Kenneth, P.R. 2007. Effects of seminal plasma on coolong-induced capacitate changes in boar sperm. *Journal of Andrology*, 28, 416-22.
- Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Specher, D.J. and Chou, K. 2005a. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Animal of Reproduction Science*, 90, pp.347-54.
- Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Tempelman, R.J., Sprecher, D.J. and Chou, K. 2005b. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Animal of Reproduction Science*, 87, pp.121-32.
- Vargas, J.D y Aparicio, M.A. 2001. Análisis de la evolución de los censos y sistemas de producción del cerdo Ibérico. *Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 193, pp.87-118.
- Vázquez, J.M., Roca, J., Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Vázquez, J.L. and Martínez, E.A. 2008. New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology*, 70, pp.1216-24.
- Visser, D. and Salamon, S. 1974. Effect of composition of tris-based diluent on survival of boar spermatozoa following deep freezing. *Australian Journal of Biological Science*, 27, pp.485-97.
- Waberski, D., Weitze, K.F., Gleumes, T., Schwarz, M., Willmen, T. and Petzoldt, R. 1994. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*, 42, pp.831-40.
- Walter, E.M., Rieke, A., Graham, J.K. and Critser, J.K. 2008. Improved osmotic tolerance limits of boar spermatozoa treated with cholesterol-loaded methyl-bcyclodextrin. *Theriogenology*, 70, pp.1384-404.

- Waterhouse, K.E., Hofmo, P.O., Tverdal, A. and Miller, R.R.Jr. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, 131, pp.887-94
- Watson, P.F. 1981. The effect of cold shock on sperm cell membranes. En: *The Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. (Ed.) Morris, G.J. y Clarke, A. Academic Press, London. pp.189-218.
- Watson, P.F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. En: *Marshall's Physiology of Reproduction*. Volume 2: Reproduction in the Male, Ed. G.E. Lamming. Churchill Livingstone Editorial. Edimburg. pp.747-869.
- Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7, pp.871-91.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal of Reproduction Science*, 60-61, pp.481-92.
- Watson, P.F. and Behan, J.R. 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, 57, pp.1683-1693.
- Westendorf, P., Richter, L. Treu, H. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten- Verfahren. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 82, pp.261-67.
- White, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction Fertility and Development*, 5(6), pp.639-58.
- White, I.G. and Darin-Bennett, A. 1976. The lipids of sperm in relation to cold shock. En: *VIII International Congress of Animal Reproduction Artificial Insemination* (Krakow), 4, pp.951-4.
- Wilmot, I. and Polge C., 1977a. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 1. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. *Cryobiology*, 14, pp.471-8.
- Wilmot, I. and Polge, C., 1977b. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 3. The fertilizing capacity of frozen and thawed boar semen. *Cryobiology*, 14, pp.483-91.
- Winthers, L.A. and King, P.J. 1979. Proline: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiology*, 64, pp.675-8.

- Woelders, H., Matthijs, A. and Engel, B. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*, 35, pp.93-105.
- Wolf, D.E. 1995. Lipid domains in sperm plasma membranes. *Molecular Membrane Biology*, 12, pp.101-4.
- Wolf, D.E., Lipscomb, A.C. and Maynard, V.M. 1988. Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry*, 27, pp.860-5.
- Wolfe, C.A., James, P.S., Mackie, A.R., Ladha, S. and Jones, R. 1998. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59, pp.1506-14.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J.D. Ed Raven Press (New York, USA). pp.135-85.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J.D. Ed. Raven Press (New York, USA). pp.189-317.
- Yeagle, P.L. 1992. The dynamics of membrana lipids. En: *The Structure of Biological Membranes*. (Ed.) P. Yeagle, Ed. CRC Press, Boca Raton, FL. pp.603-51.
- Zahn, F.S., Papa, F.O., Melo, C.M. and Brisola, M.L. 2005. Protein profile of equine seminal plasma: correlation to semen freezability. *Animal of Reproduction Science*, 89, pp.313-5.
- Zeng, W. and Terada, T. 2000. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reproduction Fertility and Development*, 12, pp.223-8.
- Zeng, W. and Terada, T. 2001. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*, 55, pp.615-27.
- Zeng, W.X., Shimada, M., Isobe, N. and Terada, T. 2001. Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology*, 56, 447-58.
- Zhu, J., Xu, X., Cosgrove, R. and Foxcroft, G.R. 2000. Effects of seminal plasma from different fractions of individual ejaculates on IVF in pigs. *Theriogenology*, 54, pp.1443-52.